

**10.21 B**

**SESSION 2010**

---

**Filière BCPST**

---

**BIOLOGIE**

Epreuve commune aux ENS de Paris, Lyon et Cachan

**Durée : 6 heures**

---

*L'usage des calculatrices est interdit.*

## Thème de l'épreuve : les microorganismes

Le sujet qui vous est proposé comporte **un sujet de synthèse** et **deux sujets avec documents** identifiés par les lettres A et B. Des durées conseillées sont données à titre indicatif :

Sujets	Pages	Durée conseillée	Thème
synthèse	3	2 h	Les microorganismes : place dans le vivant et diversité des métabolismes trophiques (on ne traitera pas des virus).
A	4 à 15	2 h	Interactions cellules eucaryotes – <i>Plasmodium</i> .
B	16 à 24	2 h	Le génome du virus de l'hépatite D et sa réplication.

**Les sujets A et B sont totalement indépendants**, vous pouvez les aborder dans l'ordre de votre choix. Pour le sujet A, **les parties A-1 (pages 5 à 8) et A-2 (pages 9 à 15) peuvent également être traitées de manière indépendante.**

Il vous est fortement recommandé de bien **gérer votre temps** de composition afin de pouvoir aborder correctement les différentes parties de l'épreuve.

Lors de l'évaluation, les correcteurs attacheront une importance particulière à :

- la justification des raisonnements ;
- la clarté et la concision des réponses ;
- la qualité et la précision des schémas ;
- la construction des phrases, l'orthographe, la grammaire et la présentation.

---

***SUJET DE SYNTHÈSE***

---

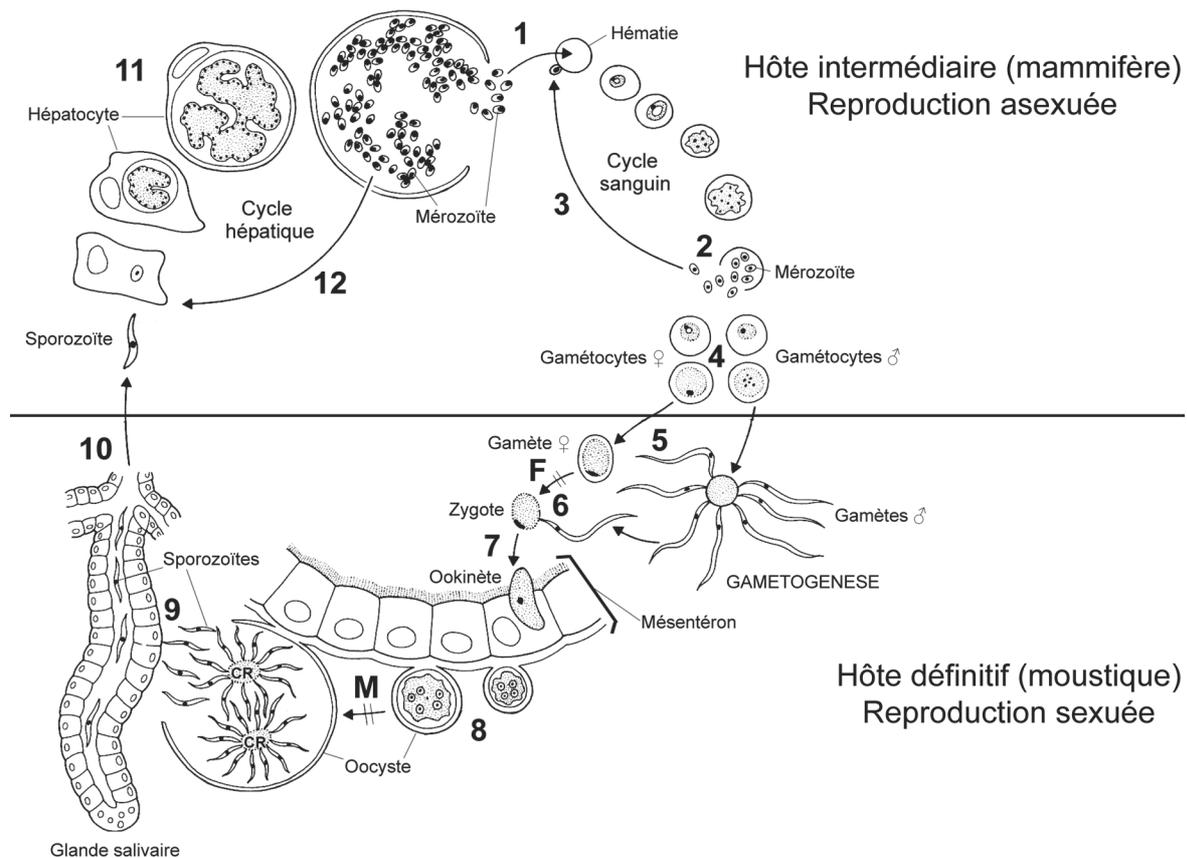
**Les microorganismes :  
place dans le vivant et diversité des  
métabolismes trophiques.**

*On ne traitera pas des virus.*

## SUJET A

### Interactions cellules eucaryotes – Plasmodium

Le paludisme (ou malaria) est l'une des parasitoses les plus dévastatrices au monde. L'agent responsable de cette maladie est le *Plasmodium*, un unicellulaire eucaryote appartenant au groupe des Apicomplexes. Il existe quatre espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'Homme, la plus virulente étant *Plasmodium falciparum*. La maladie est transmise au moment de la piqûre par un moustique femelle infecté du genre *Anopheles*. Le cycle de développement de *Plasmodium* comprend deux hôtes : l'hôte intermédiaire (mammifère : Homme, rongeurs, etc.) où a lieu la reproduction asexuée du parasite, et l'hôte définitif (moustique) où s'effectue la reproduction sexuée. Les étapes du cycle sont résumées à la Figure 1.



**Figure 1.** Cycle biologique de *Plasmodium*.

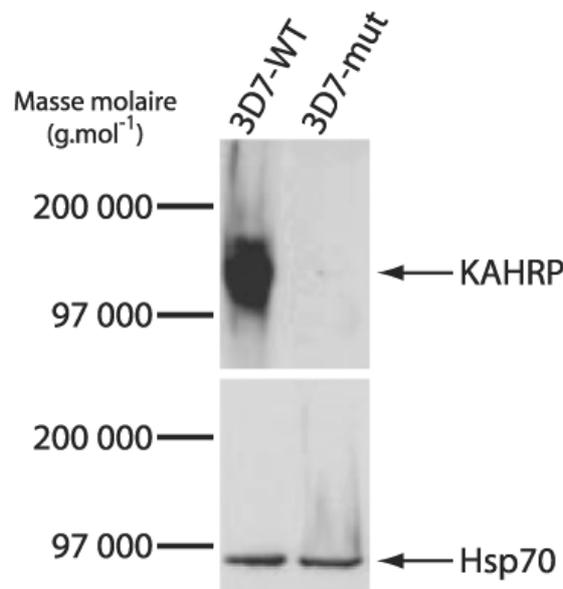
1. Invasion des hématies par les **mérozoïtes**.
2. Production de nouveaux **mérozoïtes** qui sont libérés dans le sang.
3. Invasion de nouvelles hématies et mise en place du cycle sanguin (chaque cycle dure 2 à 3 jours).
4. Différenciation, à chaque cycle sanguin, de quelques gamétocytes sexués (gamétocytes mâles et femelles).
5. Ingestion par un moustique de gamétocytes et formation des gamètes dans l'intestin moyen (mésentéron).
6. Fécondation (F), puis différenciation du zygote en ookinète.
7. Traversée de l'épithélium mésentérique par l'ookinète.
8. Formation d'un **oocyste** entre l'épithélium mésentérique et la lame basale. Méiose (M).
9. Bourgeonnement des sporozoïtes dans l'**oocyste** à partir d'une structure syncytiale ; à l'issue du bourgeonnement subsiste un corps résiduel (CR). Passage des **sporozoïtes** dans l'hémolymphe, migration des **sporozoïtes** et invasion des cellules acinaires des glandes salivaires.
10. Libération des **sporozoïtes** dans la lumière des glandes salivaires et injection, avec la salive du moustique, de plusieurs dizaines de **sporozoïtes** dans un nouvel hôte.
11. Invasion des hépatocytes (cellules du foie) par les **sporozoïtes**.
12. Libération des **mérozoïtes** et invasion de nouveaux hépatocytes (cycle hépatique durant 2 à 7 jours), puis passage des **mérozoïtes** dans le sang.

### **A-1. Adhérence des hématies infectées par *Plasmodium* à l'endothélium vasculaire**

Un des effets pathogéniques de *Plasmodium falciparum* est lié à l'augmentation de la rigidité des hématies infectées et à leur adhérence à l'endothélium vasculaire.

**Question 1. Quelles peuvent être les conséquences hémodynamiques de ces modifications des hématies infectées ?**

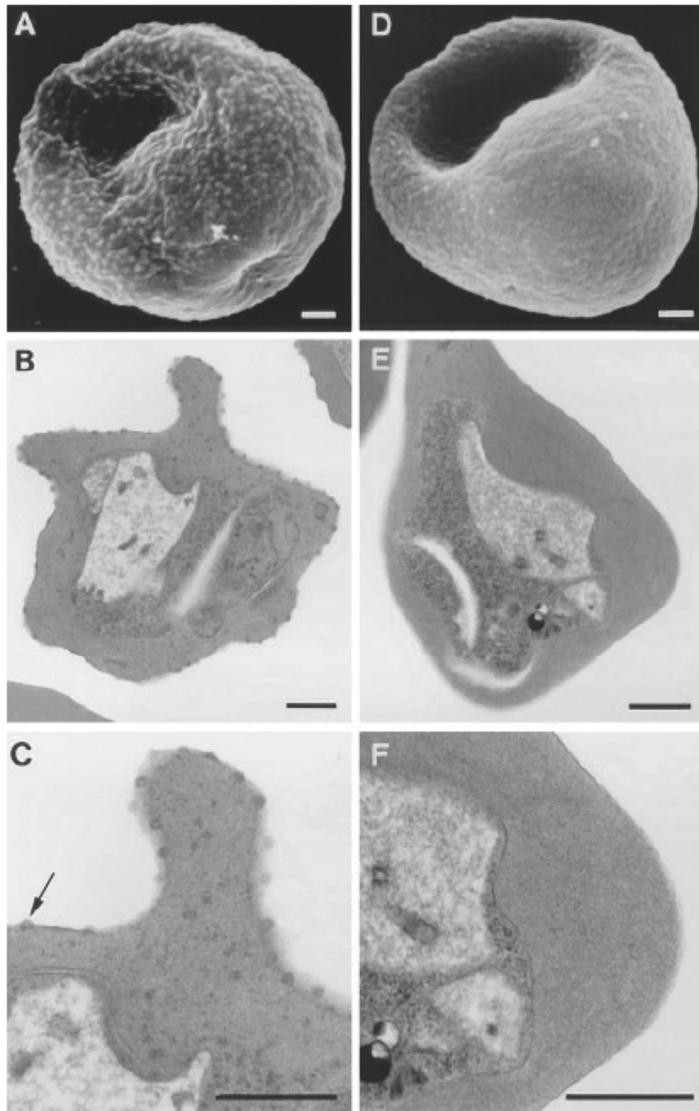
On s'intéresse au rôle de la protéine KAHRP, une protéine synthétisée par le mérozoïte en cours de maturation au sein du globule rouge. Cette protéine est localisée à la surface du globule rouge infecté dans de petites protubérances membranaires appelées *knobs*. Le gène codant la protéine KAHRP a été inactivé par recombinaison homologue dans le clone sauvage 3D7-WT de *Plasmodium falciparum*, et un clone mutant a été obtenu : le clone 3D7-mut. L'expression de la protéine KAHRP a été étudiée dans des globules rouges infectés par le clone 3D7-WT ou le clone 3D7-mut (Figure 2).



**Figure 2. Expression de la protéine KAHRP.** Les protéines extraites d'hématies infectées par le clone sauvage 3D7-WT (piste de gauche) ou le clone 3D7-mut (piste de droite) ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane. La protéine KAHRP et la protéine cellulaire Hsp70 ont été détectées à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à une enzyme donnant des produits colorés en présence du substrat adéquat.

**Question 2. Quel est l'intérêt de détecter la protéine Hsp70 ? Analysez les résultats de la figure 2.**

La Figure 3 présente des hématies infectées par le clone 3D7-WT ou par le clone 3D7-mut observées au microscope électronique.



**Figure 3. Observation d'hématies infectées par *Plasmodium* au microscope électronique.** Des hématies infectées par le clone 3D7-WT (clichés A, B et C) ou par le clone 3D7-mut (clichés D, E et F) ont été observées au microscope électronique à balayage (clichés A et D) ou au microscope électronique à transmission (clichés B, C, E et F). Barres d'échelle : 0,5  $\mu$ m.

**Question 3. Quelle structure pointe la flèche sur le cliché C ? Décrivez et analysez les résultats de la figure 3. Proposez un rôle pour la protéine KAHRP.**

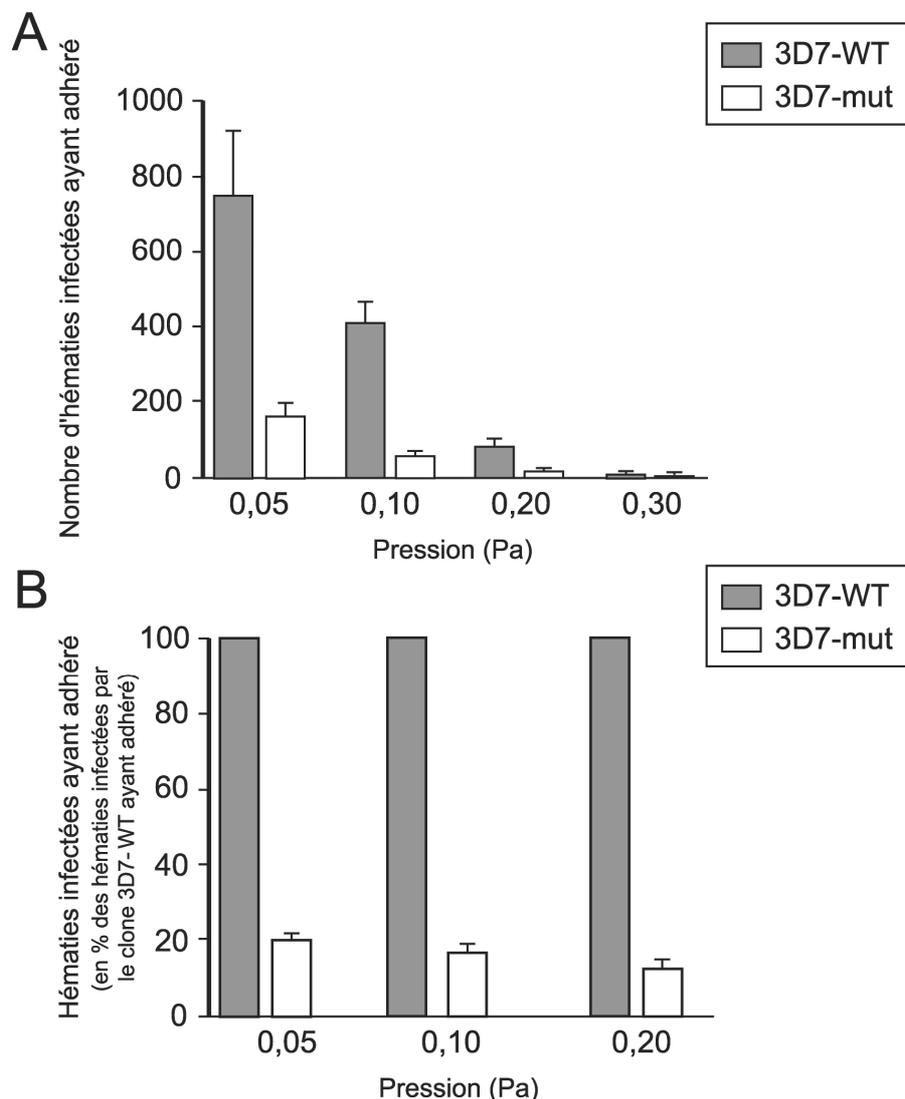
La capacité des hématies infectées par les clones 3D7-WT et 3D7-mut de *Plasmodium* à se lier à différentes molécules d'adhérence cellulaire comme CD36 (une protéine exprimée à la surface de l'endothélium lors de l'infection, des hématies et des plaquettes) et ICAM-1 (une protéine exprimée à la surface de l'endothélium lors de l'infection), a été testée *in vitro* en conditions statiques (Table 1).

**Table 1. Test d'adhérence des hématies infectées à différentes molécules purifiées.** Les résultats, exprimés en nombre d'hématies infectées liées par  $\text{mm}^2$ , représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard pour des expériences réalisées en triplicata. La BSA correspond à la sérum albumine bovine, une protéine n'ayant pas de propriété adhésive.

Clone	BSA	ICAM-1	CD36
3D7-WT	$2,8 \pm 1,5$	$11,5 \pm 8,7$	$1004 \pm 162,8$
3D7-mut	$3,0 \pm 0,28$	$2,1 \pm 1,1$	$1146 \pm 111,4$

**Question 4. Analysez les résultats de la table 1.**

*In vivo*, les hématies en circulation sont soumises au flux sanguin. On a reconstitué *in vitro* ces conditions d'écoulement. Pour cela, des plaquettes sont fixées sur des lames porte-objet. Ces dernières sont déposées dans une chambre de perfusion où l'on applique un écoulement laminaire de liquide contenant des hématies infectées par différents clones de *Plasmodium*. Le débit peut être ajusté, ce qui se traduit par différentes pressions sanguines. L'écoulement est réalisé pendant 5 à 10 minutes pour laisser passer un même nombre de cellules infectées dans toutes les expériences. Après un rinçage dans les mêmes conditions de débit mais sans cellules infectées, les lames porte-objet sont récupérées et le nombre de cellules infectées ayant adhéré pour  $10^7$  cellules infectées passées dans la chambre de perfusion, est déterminé (Figure 4A). Par ailleurs, ces mêmes résultats ont été représentés en pourcentage, en rapportant le nombre de cellules ayant adhéré dans l'expérience considérée au nombre de cellules infectées par le clone 3D7-WT de *Plasmodium* ayant adhéré dans les mêmes conditions (Figure 4B).

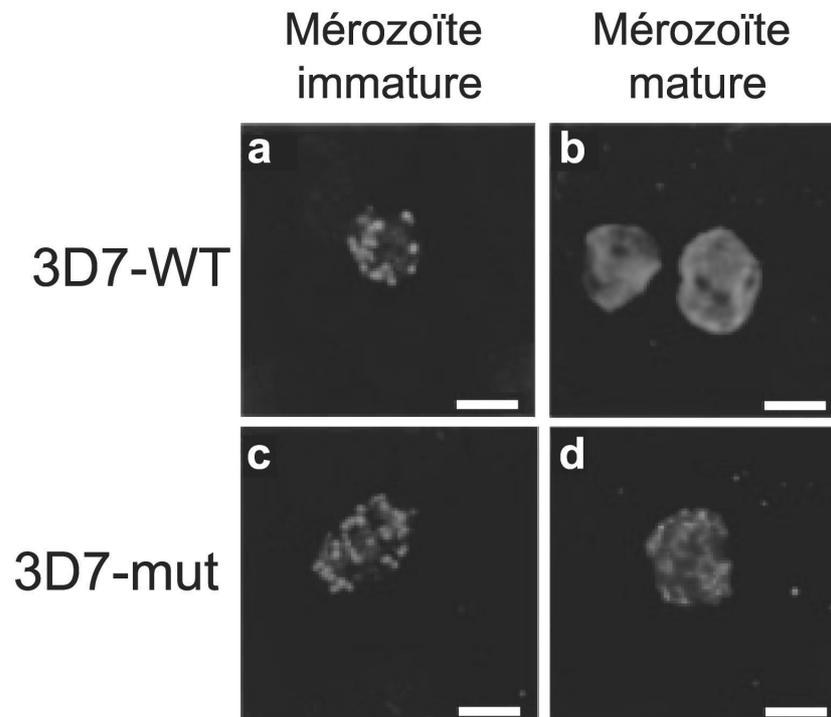


**Figure 4.** Adhérence aux plaquettes des hématies infectées par le clone 3D7-WT ou 3D7-mut, en conditions d'écoulement.

**Question 5.** Analysez les résultats de la figure 4.

**Question 6.** Confrontez les conclusions tirées de la table 1 et celles tirées de la figure 4. Comment expliquez-vous les différences observées ?

La protéine PfEMP-1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*) est une protéine du parasite connue pour être présente dans les *knobs*. PfEMP-1 est capable d'interagir avec plusieurs molécules d'adhérence dont CD36. La localisation de PfEMP-1 a été étudiée par immunofluorescence dans des hématies infectées par le clone sauvage 3D7-WT ou par le clone 3D7-mut (Figure 4).



**Figure 5. Localisation de la protéine PfEMP-1 dans des hématies infectées.** Des hématies infectées par le clone 3D7-WT (clichés a et b) ou le clone 3D7-mut (clichés c et d) de *Plasmodium* ont été observées à deux stades de développement des mérozoïtes : le stade mérozoïte immature (clichés a et c) et le stade mérozoïte mature (clichés b et d). La protéine PfEMP-1 a été détectée par un anticorps spécifique, lui-même révélé par un anticorps couplé à une substance fluorescente. Sur ces clichés, les marquages ponctuels sont dans le cytoplasme alors que les marquages diffus sont membranaires. Barres d'échelle : 5µm.

**Question 7.** Décrivez la localisation de PfEMP-1 dans les hématies infectées par le clone 3D7-WT. Quel mécanisme pourrait expliquer l'évolution de sa localisation au cours de la maturation des mérozoïtes ?

**Question 8.** Comparez l'expression et la localisation de PfEMP-1 dans les hématies infectées par les clones 3D7-mut et sauvage, aux différents stades de maturation. Quelle information supplémentaire ces résultats apportent-ils quant au rôle de KAHRP ?

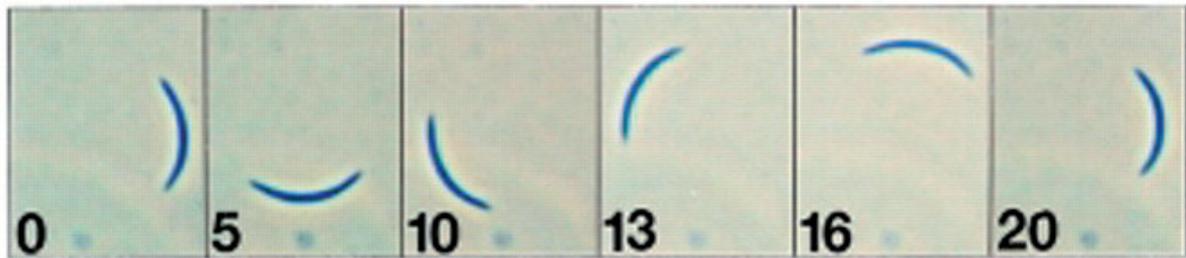
**Question 9.** Résumez en quelques lignes les conclusions tirées de la partie A1 en rappelant les fonctions possibles de KAHRP et PfEMP-1. Quel(s) rôle(s) les knobs peuvent-ils jouer ?

## **A-2. Invasion des cellules cibles par *Plasmodium***

Les stades invasifs du *Plasmodium* sont capables d'adhérer aux cellules cibles de l'hôte et d'y pénétrer par un mécanisme locomoteur original appelé *mobilité en glissant*.

**Question 10.** *A partir de la figure 1, précisez quels sont les stades invasifs de Plasmodium et, pour chaque stade, la (ou les) cellule(s) cible(s) infectée(s).*

Les cellules de *Plasmodium* sont également capables de se déplacer en glissant sur tout substrat solide. Le déplacement d'un sporozoïte de *Plasmodium berghei*, une espèce qui infecte les rongeurs de laboratoire, a été étudié *in vitro* sur une lame de verre en microscopie optique, et photographié à différents temps (Figure 6).



**Figure 6.** *Mobilité en glissant d'un sporozoïte de Plasmodium berghei.* Des sporozoïtes ont été collectés à partir de l'hémolymphe d'un moustique infecté puis déposés sur une lame de verre. Le déplacement d'un sporozoïte a ensuite été examiné au microscope sur une période de 20 s. Des photographies ont été prises à différents temps (en s) sur le même champ d'observation. L'échelle est donnée par le sporozoïte dont la longueur est d'environ 10  $\mu\text{m}$ .

**Question 11.** *Caractérisez le déplacement du parasite (direction, vitesse, changement de forme cellulaire). Quelle(s) différence(s) faites-vous entre ce mouvement et la migration d'une cellule embryonnaire animale ?*

On s'intéresse aux mécanismes de déplacement des formes invasives de *Plasmodium*. Une technique de choix pour caractériser la fonction *in vivo* d'une protéine est l'inactivation du gène correspondant par intégration dirigée d'ADN transformant dans le gène cible. Chez *Plasmodium*, l'intégration dirigée dans le gène cible d'un ADN transformant survient exclusivement par recombinaison homologue et, sur le plan technique, il n'est possible d'introduire un ADN transformant et d'obtenir des clones recombinants du parasite, qu'à partir des stades sanguins (mérozoïtes).

**Question 12.** *Comment procéderiez-vous dans le principe pour inactiver un gène d'intérêt et sélectionner des clones recombinants de Plasmodium ? Quelle particularité du génome des mérozoïtes facilite l'obtention de mutants ? Selon vous, pourquoi cette méthode ne permet-elle pas d'étudier le phénotype de tous les gènes ?*

Les protéines CS (*circumsporozoïte*) et TRAP (*thrombospondin-related anonymous protein*) sont deux protéines de surface du sporozoïte impliquées dans l'adhérence du sporozoïte aux glandes salivaires de moustique et aux hépatocytes de mammifère. Afin de tester leur rôle dans le pouvoir invasif du parasite, les gènes *CS* et *TRAP* ont été inactivés chez *Plasmodium berghei*. Les clones de mérozoïtes recombinants obtenus ont été injectés à des rats sains et les moustiques femelles d'*Anopheles stephensi* ont ensuite été nourris à partir de ces mêmes rats de façon à les infecter. Quatorze ou dix-huit jours après infection des moustiques, la proportion de moustiques infectés, les nombres totaux moyens d'oocystes produits et de sporozoïtes associés au mésentéron ou aux glandes salivaires, ainsi que les nombres moyens de sporozoïtes présents dans une goutte d'hémolymphe, ont été déterminés (Table 2). Enfin, dans chaque condition, les glandes salivaires de moustique ont été traitées à la trypsine et lavées (ce traitement permet d'éliminer les parasites retenus à la surface des cellules), puis lysées de façon à libérer et compter les seuls sporozoïtes intracellulaires (Table 2).

**Table 2. Caractéristiques du développement d'une souche sauvage (WT) et des clones recombinants (TRAP<sup>+</sup>, CS<sup>+</sup>, TRAP<sup>-</sup> et CS<sup>-</sup>) de *Plasmodium berghei*, chez le moustique femelle *Anopheles stephensi*.** Les clones TRAP<sup>+</sup> et CS<sup>+</sup> sont des contrôles issus d'un événement de recombinaison mais possédant respectivement un gène *TRAP* sauvage et un gène *CS* sauvage. Dans l'analyse des résultats, on considérera que les différences observées entre les clones WT, TRAP<sup>+</sup> et CS<sup>+</sup> ne sont pas significatives.

Population de parasite	Mésentéron			Hémolymphe	Glandes salivaires	
	Moustiques infectés <sup>a</sup> (en %)	Nombre d'oocystes <sup>b</sup>	Nombre de sporozoïtes <sup>b</sup>	Nombre de sporozoïtes par goutte <sup>c</sup>	Nombre total de sporozoïtes <sup>b</sup>	Sporozoïtes intracellulaires <sup>d</sup> (en %)
	Jour 14	Jour 14	Jour 18	Jour 18	Jour 18	Jour 18
WT	91	31	21 000	4 000	19 000	77
Clone TRAP <sup>+</sup>	90	25	24 000	2 000	20 000	80
Clone CS <sup>+</sup>	89	39	22 000	3 000	22 000	79
Clone TRAP <sup>-</sup>	92	42	25 000	6 000	500	13
Clone CS <sup>-</sup>	85	40	0	0	0	0

<sup>a</sup> Pourcentage déterminé à partir d'une population de 150 moustiques 14 jours après que ceux-ci ont reçu un repas infectieux de sang.

<sup>b</sup> Nombre total moyen d'oocystes ou de sporozoïtes par moustique infecté, obtenu à partir de 3 expériences d'infection.

<sup>c</sup> Nombre moyen de sporozoïtes par goutte d'hémolymphe, obtenu à partir de 3 expériences d'infection.

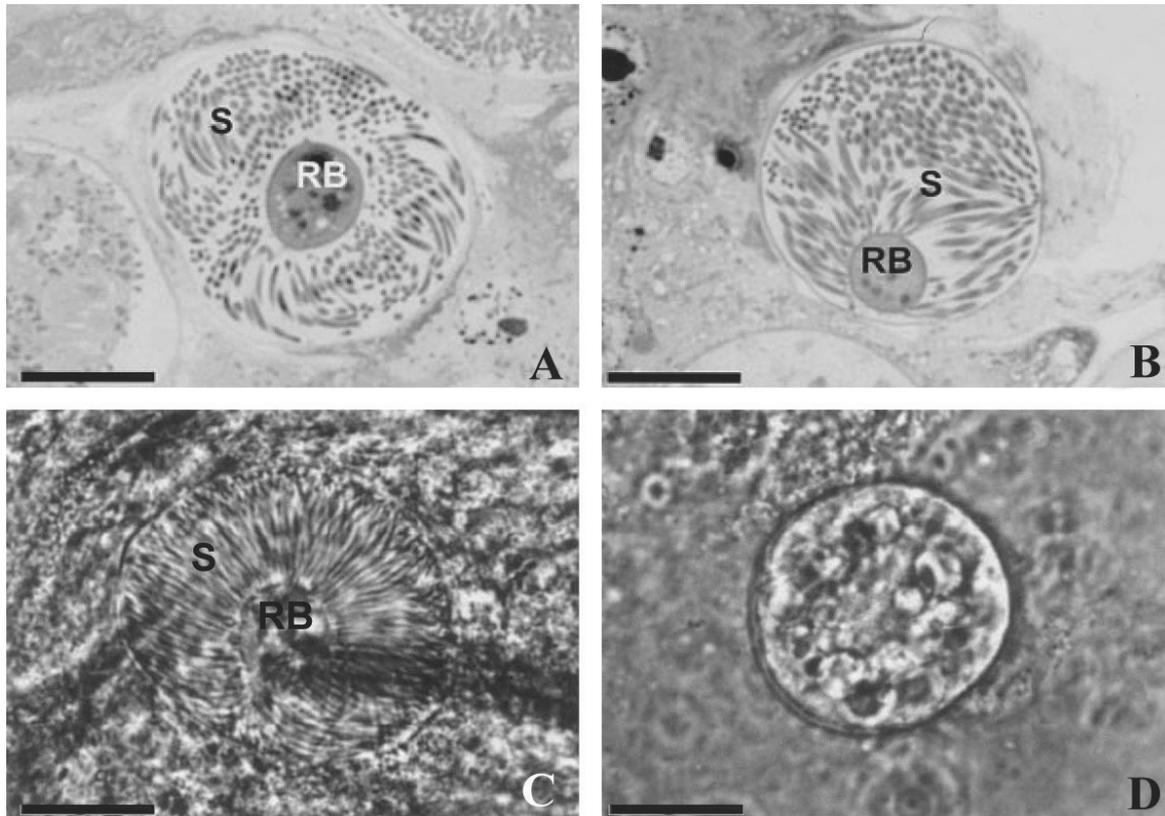
<sup>d</sup> Proportion de sporozoïtes intracellulaires par rapport aux sporozoïtes totaux des glandes salivaires.

**Question 13. Pourquoi a-t-on cherché à déterminer le nombre de sporozoïtes intracellulaires dans les glandes salivaires des moustiques infectés ?**

**Question 14. Analysez et interprétez les résultats obtenus avec le clone TRAP<sup>-</sup>.**

**Question 15. Analysez les résultats obtenus avec le clone CS<sup>-</sup>. Formulez une hypothèse quant au rôle de la protéine CS dans le développement de *Plasmodium* chez le moustique.**

Le développement des oocystes a été étudié par microscopie 14 jours après infection des moustiques par des populations sauvages, des clones TRAP<sup>-</sup> ou des clones CS<sup>-</sup> de *Plasmodium berghei* (Figure 7).



**Figure 7.** Développement des oocystes dans le mésentéron de moustiques d'*Anopheles stephensi*, 14 jours après un repas infectieux de sang. S : Sporozoïtes. RB : corps résiduel. Barres d'échelle : 10 µm.

A et B, Coupes respectives d'oocyste sauvage et d'oocyste TRAP<sup>-</sup> de *Plasmodium berghei*, observées au microscope électronique à transmission.

C et D, Coupes respectives d'oocyste sauvage et d'oocyste CS<sup>-</sup> de *Plasmodium berghei*, observées au microscope optique.

**Question 16.** Analysez et interprétez ces résultats. Concluez quant au rôle de la protéine CS révélé dans cette expérience.

Des sporozoïtes associés au mésentéron et aux glandes salivaires de moustique ont été collectés 18 jours après infection des moustiques par des populations sauvages ou des clones TRAP<sup>-</sup> de *Plasmodium berghei*, puis injectés par voie intraveineuse dans de jeunes rats. Pour chaque condition d'injection, le nombre de rats infectés et le temps moyen de détection des premiers mérozoïtes dans le sang ont été déterminés (Table 3).

**Table 3. Infection des rats par des souches sauvage (WT) et des clones recombinants (TRAP<sup>+</sup> et TRAP<sup>-</sup>) de *Plasmodium berghei*.** Les caractéristiques du clone TRAP<sup>+</sup> sont données à la table 2.

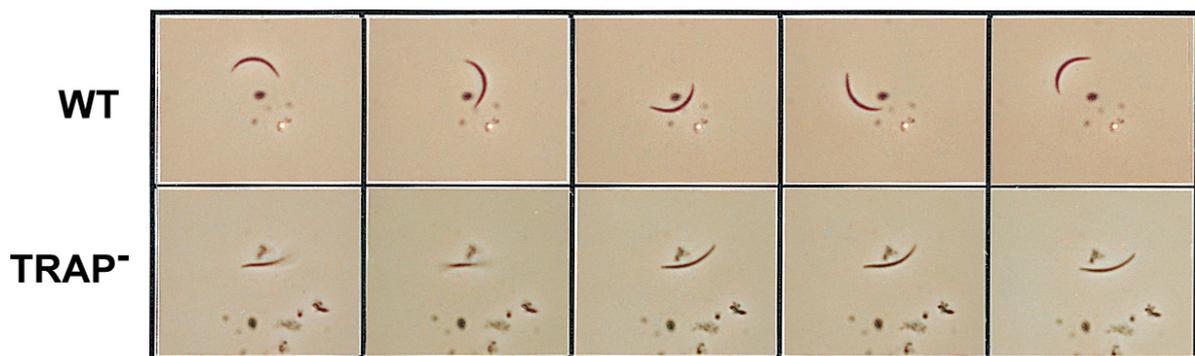
Population de parasite	Sporozoïtes associés au mésentéron			Sporozoïtes associés aux glandes salivaires		
	Nombre de sporozoïtes injectés	Nombre de rats infectés / injectés <sup>a</sup>	Période de latence <sup>b</sup>	Nombre de sporozoïtes injectés	Nombre de rats infectés / injectés <sup>a</sup>	Période de latence <sup>b</sup>
WT	50 000	2/2	5,5	30	2/2	5,5
	100 000	2/2	5,0	150	2/3	4,7
	1 000 000	2/2	4,0	1 500	2/2	4,0
Clone TRAP <sup>+</sup>	100 000	2/2	5,0	15 000	4/4	3,0
	1 000 000	2/2	4,5	30	3/3	5,3
				150	3/3	5,0
				1 500	3/3	4,0
				15 000	4/4	3,0
Clone TRAP <sup>-</sup>	5 000 000	0/2	-	20 000	0/3	-
				100 000	1/2	6,0

<sup>a</sup> Nombre de rats infectés / nombre de rats injectés. Dans l'expérience, un rat est considéré comme infecté lorsqu'il devient possible de détecter des mérozoïtes dans son sang.

<sup>b</sup> Nombre moyen de jours entre le moment d'injection des sporozoïtes et le moment d'apparition des premiers mérozoïtes. La moyenne est obtenue à partir des seules infections ayant réussi.

**Question 17. Analysez et interprétez les résultats obtenus pour les populations contrôles (sauvage et TRAP<sup>+</sup>) de *Plasmodium berghei*, puis pour le clone TRAP<sup>-</sup>.**

La mobilité des sporozoïtes TRAP<sup>-</sup> isolés à partir de glandes salivaires de moustiques infectés a été étudiée *in vitro* au microscope à contraste de phase. Les résultats sont présentés à la Figure 8.

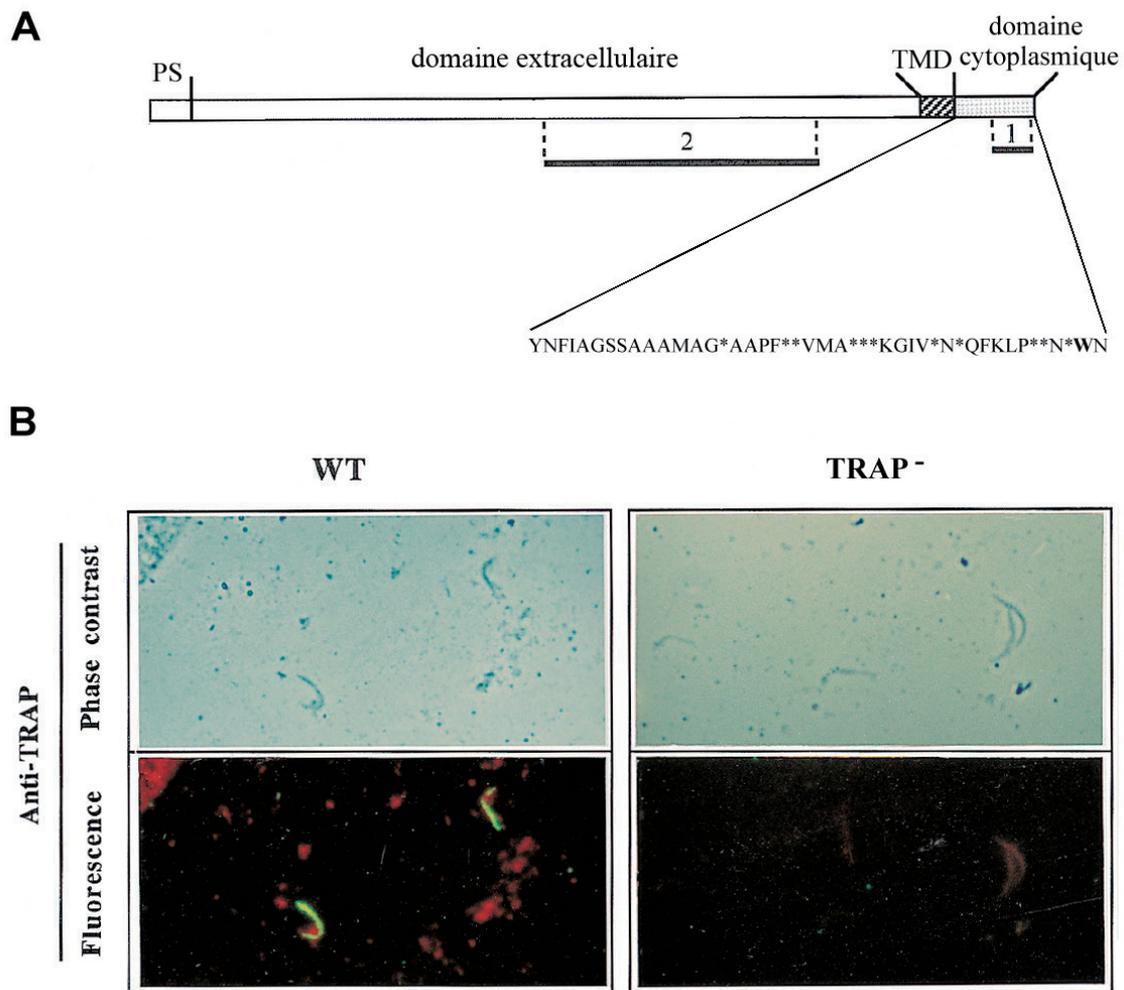


**Figure 8. Mouvement d'un sporozoïte de *Plasmodium berghei* sauvage (WT) et d'un sporozoïte TRAP<sup>-</sup>.** Les sporozoïtes ont été collectés à partir des glandes salivaires de moustiques 18 jours après leur infection par la forme sauvage (WT) ou recombinante (TRAP<sup>-</sup>) de *Plasmodium berghei*, puis déposés sur une lame de verre. Le déplacement d'un sporozoïte a ensuite été examiné au microscope à contraste de phase sur une période de 20 s. Des photographies ont été prises à intervalles de temps réguliers de 5 s sur le même champ d'observation. L'échelle est la même qu'à la figure 6.

**Question 18. Quel est l'effet de l'inactivation du gène TRAP sur la locomotion du sporozoïte ?**

**Question 19. A partir des informations obtenues jusqu'ici, récapitulez les fonctions de TRAP *in vivo*.**

Des sporozoïtes sauvages et TRAP<sup>-</sup> collectés à partir de mésentérons de moustiques infectés par la forme sauvage (WT) ou recombinante (TRAP<sup>-</sup>) de *Plasmodium berghei*, ont été déposés sur une lame de verre et, une minute après, la préparation a été fixée par séchage à l'air libre. Ensuite, leur membrane cellulaire a été perméabilisée et la protéine TRAP a été détectée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 1 de TRAP (Figure 9A). Les résultats du marquage sont donnés à la Figure 9B.



**Figure 9. A, Représentation schématique de la protéine TRAP de *Plasmodium berghei*.** TRAP comprend un peptide signal (PS) d'adressage au réticulum endoplasmique granuleux, un domaine extracellulaire d'adhérence aux cellules cibles (rectangle blanc), un domaine transmembranaire (TMD, rectangle hachuré obliquement) et un domaine cytoplasmique (rectangle grisé). Les régions 1 et 2 de la protéine TRAP (indiquées par des tirets) ont été utilisées pour générer des anticorps reconnaissant spécifiquement le domaine cytoplasmique et le domaine extracellulaire de TRAP, respectivement. La séquence en acides aminés du domaine cytoplasmique est donnée. Dans cette séquence, la position des résidus acides est indiquée par des étoiles et la position d'un tryptophane conservé (W) est indiquée en gras.

**B, Immunodétection de la protéine TRAP.** Les sporozoïtes fixés et perméabilisés ont d'abord été incubés en présence d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 1 de TRAP. Après incubation, les sporozoïtes ont été lavés et les anticorps anti-TRAP ont été révélés par un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine, une substance donnant une fluorescence verte. Les sporozoïtes sauvages (WT) et TRAP<sup>-</sup> ont été observés au microscope à contraste de phase ('Phase contrast') et au microscope à fluorescence ('Fluorescence'). Pour chaque condition (WT ou TRAP<sup>-</sup>), le même champ d'observation a été photographié. On précise que le marquage rouge correspond à une fluorescence naturelle non spécifique.

**Question 20.** Pourquoi est-il nécessaire dans cette expérience de perméabiliser la membrane des sporozoïtes ? Analysez et interprétez ces résultats.

La comparaison des séquences de la protéine TRAP chez diverses espèces d'Apicomplexes a montré que la région terminale du domaine cytoplasmique de TRAP est hautement conservée : on retrouve toujours un tryptophane conservé et un nombre important de résidus acides conservés (Figure 9A). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'obtenir trois nouveaux clones de mérozoïtes : le clone 'Δ' exprime une protéine TRAP dont le domaine cytoplasmique a été éliminé, le clone 'TRYP' possède une protéine TRAP dont le tryptophane conservé a été remplacé par une alanine, le clone 'ACID' présente une protéine TRAP dont les trois derniers résidus acides dans la séquence ED[N]D (où D et E sont des résidus acides, aspartate et glutamate, et N l'asparagine) ont été remplacés par des résidus non acides dans la séquence AS[N]A (où A est l'alanine et S la sérine). Les clones de mérozoïtes recombinants Δ, TRYP et ACID ont été injectés dans des rats sains et les moustiques femelles d'*Anopheles stephensi* ont ensuite été nourris à partir de ces mêmes rats de façon à les infecter. Après 14 à 18 jours d'incubation, les sporozoïtes ont été collectés à partir du mésentéron, de l'hémolymphe et des glandes salivaires et, dans chaque cas, leur nombre a été déterminé ainsi que la capacité des sporozoïtes extraits à partir des glandes salivaires à infecter de jeunes rats (Table 4). Enfin, la mobilité des sporozoïtes extraits de l'hémolymphe des moustiques infectés a été analysée. Les sporozoïtes 'Δ' présentent un phénotype de déplacement comparable à celui observé pour les sporozoïtes TRAP<sup>+</sup> (Figure 8). Les phénotypes de déplacement des sporozoïtes TRYP et ACID sont donnés à la Figure 10.

**Table 4. Phénotype des populations sauvages (WT) et recombinantes (TRAP<sup>+</sup>, Δ, TRYP et ACID) de *Plasmodium berghei*.** Les caractéristiques du clone TRAP<sup>+</sup> sont données à la table 2. ND : Non déterminé.

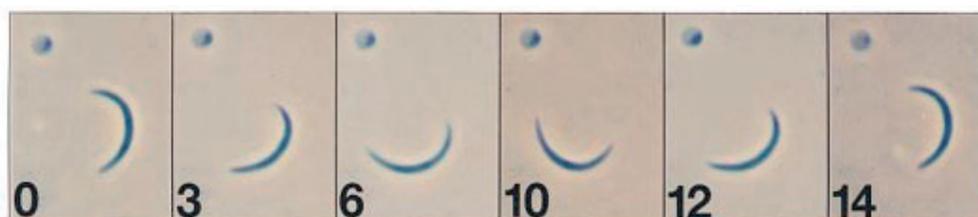
Population de parasite	Nombre de sporozoïtes			Capacité des sporozoïtes associés aux glandes salivaires à infecter de jeunes rats		
	Mésentéron <sup>a</sup>	Hémolymphe <sup>b</sup>	Glandes salivaires <sup>a</sup>	Nombre de sporozoïtes injectés	Nombre de rats infectés / injectés <sup>c</sup>	Période de latence <sup>d</sup>
WT	17 000	4 000	19 000	15 000	4/4	3
Clone TRAP <sup>+</sup>	20 000	3 500	16 000	15 000	3/3	3
Clone Δ	23 000	ND	1 000	15 000	0/3	-
Clone TRYP	20 000	4 000	2 000	15 000	0/3	-
Clone ACID	21 000	4 500	800	15 000	0/3	-

<sup>a</sup> Nombre total moyen de sporozoïtes par moustique infecté, obtenu à partir de 3 expériences d'infection.

<sup>b</sup> Nombre moyen de sporozoïtes par goutte d'hémolymphe, obtenu à partir de 3 expériences d'infection.

<sup>c</sup> Nombre de rats infectés / nombre de rats injectés.

<sup>d</sup> Nombre moyen de jours entre le moment d'injection des sporozoïtes et le moment d'apparition des premiers mérozoïtes. La moyenne est obtenue à partir des seules infections ayant réussi.

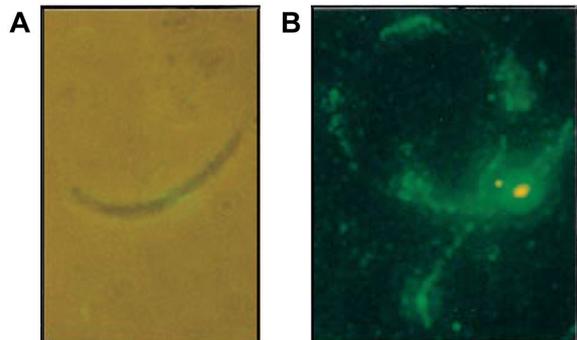


**Figure 10.** Mouvement d'un sporozoïte de *Plasmodium berghei* TRYP. Des sporozoïtes ont été collectés à partir de l'hémolymphe de moustiques infectés puis disposés sur une lame de verre. Le déplacement d'un sporozoïte TRYP a ensuite été examiné au microscope sur une période de 14 s. Des photographies ont été prises aux différents temps indiqués (en s) sur le même champ d'observation. Le phénotype de déplacement des sporozoïtes ACID est tout à fait comparable au phénotype présenté. L'échelle est la même qu'à la figure 6.

**Question 21.** Analysez et interprétez l'ensemble des résultats obtenus pour le clone Δ. Quelle peut être la fonction du domaine cytoplasmique de TRAP dans le mécanisme de déplacement ?

**Question 22.** Analysez et interprétez les résultats de la table 4 obtenus pour les sporozoïtes TRYP et ACID. Comparez leur phénotype de mobilité à celui des sporozoïtes sauvages présenté à la figure 6.

Des sporozoïtes sauvages collectés à partir de mésentérons de moustiques infectés ont été déposés sur une lame de verre et, après les avoir laissés se déplacer pendant une minute, la préparation a été fixée par séchage à l'air libre, puis marquée à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 2 de TRAP (Figures 9A). Les résultats de cette expérience sont présentés à la Figure 11.



**Figure 11. Immunodétection de la protéine TRAP chez un sporozoïte sauvage se déplaçant sur une lame de verre.** Les sporozoïtes sauvages fixés ont été incubés en présence d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 2 de TRAP. Après incubation, les sporozoïtes ont été lavés et les anticorps anti-TRAP ont été révélés selon le même protocole que celui présenté à la Figure 9B. Le résultat du marquage au microscope à fluorescence est présenté sur le cliché B. Le cliché A représente le même champ d'observation au microscope à contraste de phase. L'avant du sporozoïte se situe à droite des deux clichés.

**Question 23.** Analysez et interprétez ces résultats.

**Question 24.** Comparez les résultats de la figure 11 avec ceux obtenus avec les sporozoïtes sauvages de la figure 9B. Qu'en déduisez-vous ? Proposez alors une explication au phénotype de déplacement *in vitro* des sporozoïtes TRYP et ACID.

Des sporozoïtes sauvages collectés à partir de mésentérons de moustiques infectés ont été fixés en présence de formaldéhyde, déshydratés et inclus dans une résine. Des coupes ultrafines ont été réalisées, et la protéine TRAP a été détectée par microscopie électronique à transmission à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 2 de TRAP (Figure 9A). Les résultats du marquage sont donnés à la Figure 12.



**Figure 12. Immunodétection de la protéine TRAP en microscopie électronique à transmission.**

**A,** Ultrastructure de sporozoïtes sauvages observés en microscopie électronique à transmission. Notez le noyau (N) et les vésicules de sécrétion (flèches) localisées à l'avant du sporozoïte.

**B,** Des coupes ultrafines de sporozoïte sauvage ont été incubées en présence d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la région 2 de TRAP. Après incubation, les coupes ont été rincées et les anticorps anti-TRAP ont été révélés grâce à l'utilisation d'un deuxième anticorps couplé à des microbilles d'or, lesquelles donnent des points noirs caractéristiques en microscopie électronique. Les plages grisées denses aux électrons correspondent aux vésicules de sécrétion du sporozoïte. Le cliché présenté ici correspond à un agrandissement de la zone encadrée en A.

**Question 25.** Analysez ces résultats. A partir de l'ensemble des informations obtenues jusqu'ici, récapitulez l'évolution de la localisation cellulaire de TRAP.

D'autres expériences ont montré que le déplacement des sporozoïtes *in vitro* sur une lame de verre est sensible aux inhibiteurs de myosine et aux cytochalasines, des substances qui dépolymérisent l'actine.

**Question 26.** Que pouvez-vous déduire de cette information ? A l'aide d'un schéma, proposez un modèle d'invasion des cellules cibles par les sporozoïtes.

## SUJET B

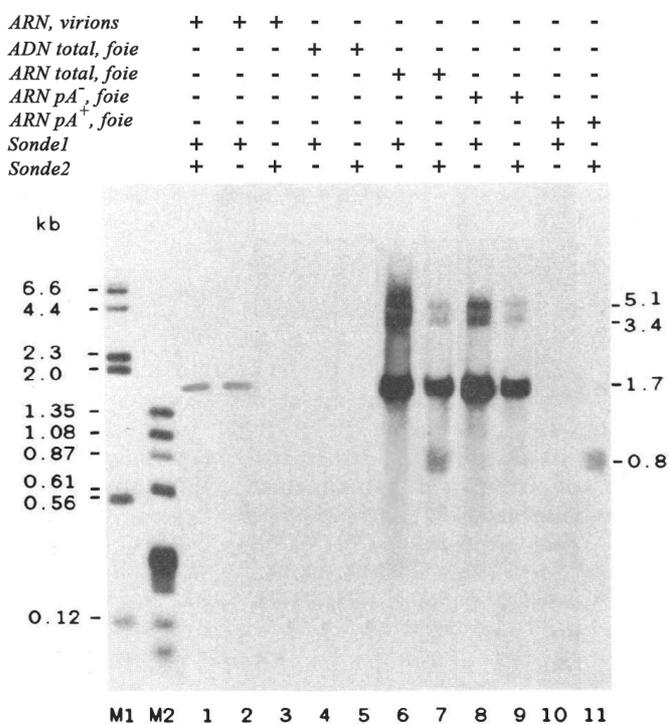
### Le génome du virus de l'hépatite D et sa répllication

En 1977, un nouvel antigène, l'antigène  $\delta$ , a été mis en évidence chez des individus infectés par le virus de l'hépatite B humain (HBV). Il n'est retrouvé que chez les individus infectés par HBV, mais n'est pas présent chez tous les individus infectés. Cet antigène est en fait un constituant d'un nouveau virus, le virus de l'hépatite D (HDV), qui ne peut se transmettre qu'en présence de HBV. HDV ne code qu'une seule protéine de  $26\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , l'antigène  $\delta$ , indispensable à la répllication du génome viral. On rappelle que le génome viral correspond à l'acide nucléique contenu dans le virion (particule virale) et que la masse molaire moyenne d'un acide aminé est de  $110\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

#### **B-1. Analyse du génome viral dans les virions et les cellules infectées**

Les ARN totaux ont été purifiés à partir de cellules de foie infecté, convertis *in vitro* en ADN double brin par transcription inverse, puis introduits dans des plasmides. Les plasmides ayant intégré de l'ADN correspondant à des séquences virales ont été identifiés par hybridation avec des acides nucléiques radiomarqués préparés à partir de virions extraits du sérum de malades. Cette procédure a permis d'isoler un fragment d'ADN de 650 nucléotides correspondant au génome de HDV, à partir duquel ont été synthétisées des sondes radioactives d'ADN simple brin correspondant à l'un (*Sonde1*) ou à l'autre (*Sonde2*) des deux brins.

Différents types d'acides nucléiques purifiés à partir du sérum ou du foie de chimpanzés infectés sont séparés sur un gel d'agarose dans des conditions où les acides nucléiques migrent uniquement en fonction de leur taille indépendamment de leur forme (circulaire ou linéaire) et où ils sont totalement dénaturés. Puis, ils sont transférés sur une membrane de nitrocellulose et hybridés avec l'une ou l'autre des sondes d'ADN simple brin viral (Figure 13).



**Figure 13.** Analyse par électrophorèse sur un gel de 1% d'agarose des acides nucléiques viraux purifiés à partir du sérum ou du foie de chimpanzés infectés, en conditions dénaturantes. Pour chaque piste, les échantillons analysés et la sonde utilisée (*Sonde1* ou *Sonde2*) sont décrits au-dessus de la figure (+ : présence ; - : absence). **ARN, virions** : ARN extraits de virions purifiés du sérum ; **ADN total, foie** : ADN totaux extraits d'un échantillon de foie infecté ; **ARN total, foie** : ARN totaux extraits d'un échantillon de foie infecté ; **ARN pA<sup>-</sup>, foie** : ARN sans queue polyA extraits d'un échantillon de foie infecté ; **ARN pA<sup>+</sup>, foie** : ARN avec queue polyA extraits d'un échantillon de foie infecté. **M1 et M2** : deux marqueurs de taille (molécules d'ADN linéaires). La taille approximative des fragments observés est donnée à droite de la figure et exprimée en kilobases (**kb**).

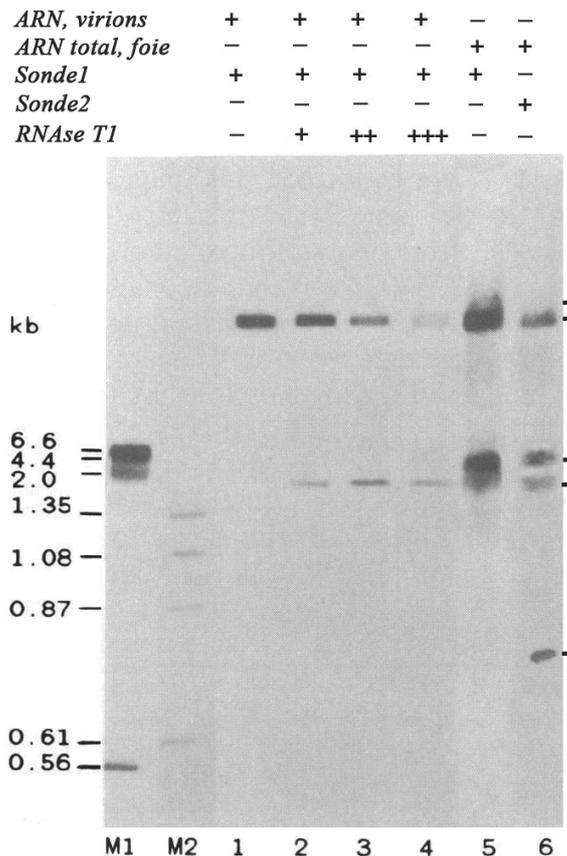
**Question 27.** Que pouvez-vous déduire, concernant le génome du virus, des résultats obtenus à partir des acides nucléiques extraits des particules virales (pistes 1 à 3) ?

**Question 28.** *Interprétez, en justifiant vos déductions, les bandes à 1,7 kb obtenues à partir des cellules infectées de foie (pistes 4 à 11). Quelle(s) pourrai(en)t être la (les) fonction(s) dans les cellules infectées d'un acide nucléique viral de 1,7 kb différent de celui présent dans les virions ?*

**Question 29.** *Exposez les arguments montrant que certains acides nucléiques viraux se présentent sous forme multimérique dans les cellules infectées de foie.*

**Question 30.** *Comment interprétez-vous la bande à 0,8 kb ? Quelle pourrait être la fonction de l'acide nucléique correspondant ? (justifiez votre réponse)*

Les ARN extraits de virions sont traités par des quantités croissantes de RNase T1 (une endonucléase clivant les ARN en aval des guanines) en utilisant des conditions de digestion très ménagées conduisant à une seule ou un très petit nombre de coupures par molécule d'ARN. Ces ARN, ainsi que des ARN de foie infecté non digérés par la RNase T1, sont mis à migrer sur un gel de polyacrylamide en présence de 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée, un agent dénaturant totalement les acides nucléiques. Les ARN sont alors révélés par l'une ou l'autre sonde (Figure 14). On précise que, dans ces conditions d'électrophorèse, les ARN de grande taille sont très mal séparés (notez que, pour le marqueur de taille M1, les ARN de plus de 2 kb migrent sensiblement au même niveau) et que la migration des macromolécules est très dépendante de leur forme (circulaire ou linéaire).

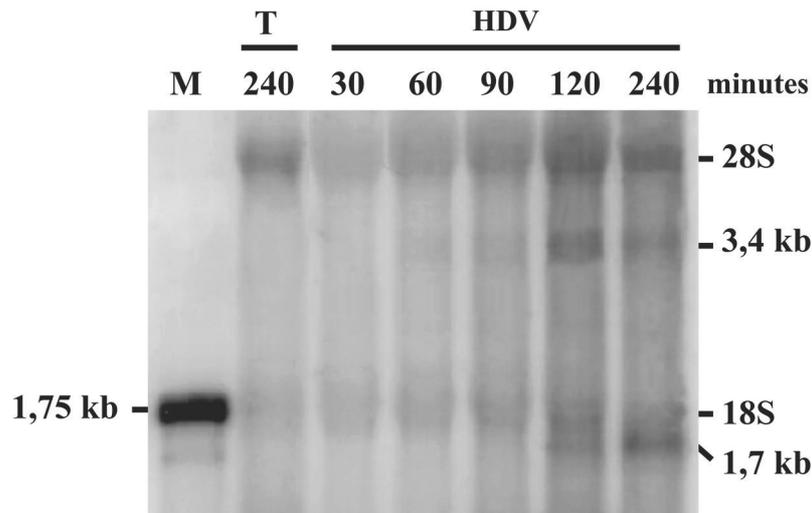


**Figure 14.** Analyse par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 3% en présence de 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée des ARN viraux extraits de virions ou de cellules infectées. Les échantillons analysés dans chaque piste et les sondes utilisées sont décrits au-dessus de la figure (+ : présence ; - : absence) et dans la légende de la figure 13. Les quantités croissantes de RNase T1 utilisées sont notées +, ++ et +++. M1 et M2 : deux marqueurs de taille (molécules d'ADN linéaires). kb : kilobases.

**Question 31.** *En comparant les résultats obtenus pour les virions (pistes 1 à 4) avec ceux de la figure 13 (piste 2), exposez les arguments montrant que le génome viral est constitué d'une molécule d'ARN circulaire. Commentez les variations d'intensité des bandes observées en fonction de la concentration de RNase T1.*

**Question 32.** *Récapitulez les types d'acides nucléiques viraux présents dans les pistes 6 et 7 de la figure 13, en précisant dans chaque cas l'abondance relative des formes linéaire et circulaire, à l'aide des résultats de la figure 14 (pistes 5 et 6).*

Un ADN double brin de 1,9 kb représentant un peu plus d'un tour du génome de HDV est cloné dans un plasmide de manière à pouvoir synthétiser *in vitro* l'ARN antigénomique (ARN complémentaire du génome viral). Cet ARN ainsi produit est introduit avec l'ARN HDAG (un ARN produit artificiellement, coiffé et polyadénylé codant l'antigène  $\delta$ ) dans la lignée cellulaire hépatique Huh7 (expériences de transfection). Quatre jours plus tard, les cellules sont cultivées pendant des temps croissants (de 30 à 240 minutes) en présence de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate (une molécule radioactive pouvant pénétrer dans les cellules), les ARN sont purifiés, mis à migrer sur un gel d'agarose dans les mêmes conditions qu'à la figure 13 et autoradiographiés (Figure 15). Enfin, des expériences de transfection identiques réalisées avec de l'ARN génomique au lieu de l'ARN antigénomique, donnent un résultat très similaire.



**Figure 15.** Analyse des ARN cellulaires totaux après transfection de l'ARN antigénomique et de l'ARN HDAG dans des cellules Huh7 et marquage pendant 30 à 240 minutes au  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate. Les temps de marquage sont indiqués au-dessus de chaque piste. Des échantillons contenant des quantités identiques de radioactivité ont été déposés dans chaque piste. **M** : marqueur de taille (molécules d'ADN linéaires). **T** : ARN de cellules Huh7 non transfectées. **HDV** : ARN de cellules Huh7 transfectées par l'ARN antigénomique de HDV et l'ARN HDAG. **18S** et **28S** : ARN ribosomiques 18S et 28S (ARN les plus abondants dans les cellules eucaryotes). **kb** : kilobases.

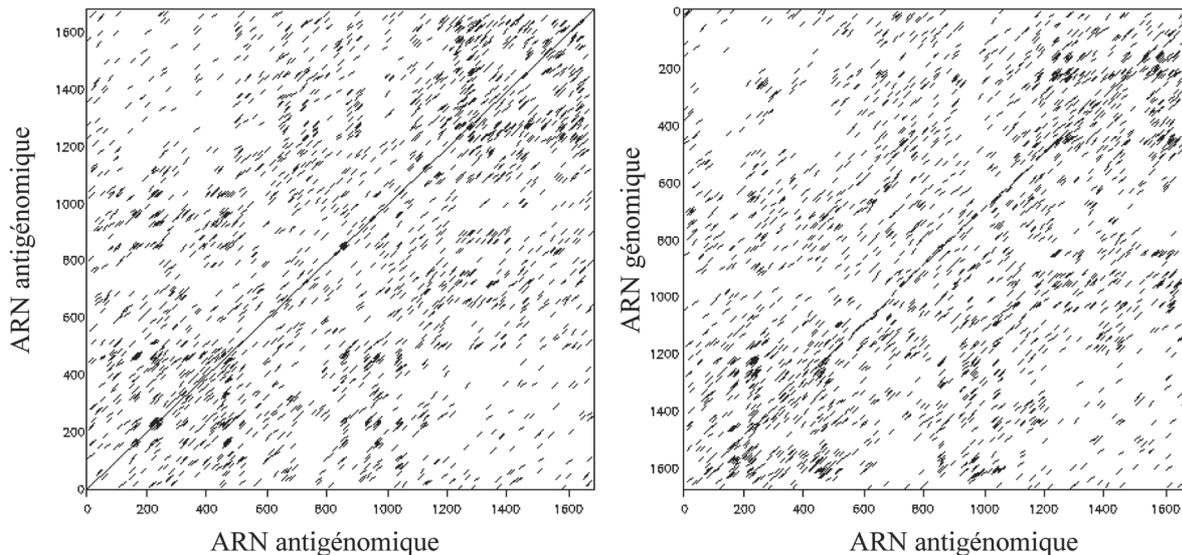
**Question 33.** Comment interprétez-vous dans les cellules infectées la variation d'intensité de la radioactivité au cours du temps pour la bande 28S ? Analysez et interprétez l'évolution de l'intensité relative des bandes à 1,7 et à 3,4 kb. Quelles conclusions en tirez-vous ?

**Question 34.** Récapitulez les types d'ARN viraux présents dans les cellules infectées (pistes 5 et 6, figure 14) et proposez des hypothèses sur le mécanisme d'expression et de répllication du génome viral compatibles avec ces observations.

L'ARN génomique, d'une longueur de 1679 nucléotides, a été entièrement séquencé. Sa séquence complémentaire (ARN antigénomique) est analysée par Dot-plot (une technique d'analyse bioinformatique décrite dans la légende de la figure 16) soit contre elle-même (Figure 16A) soit contre la séquence génomique (Figure 16B). Pour l'analyse, les séquences d'ARN antigénomique et génomique sont représentées sous forme linéaire avec une origine choisie arbitrairement.

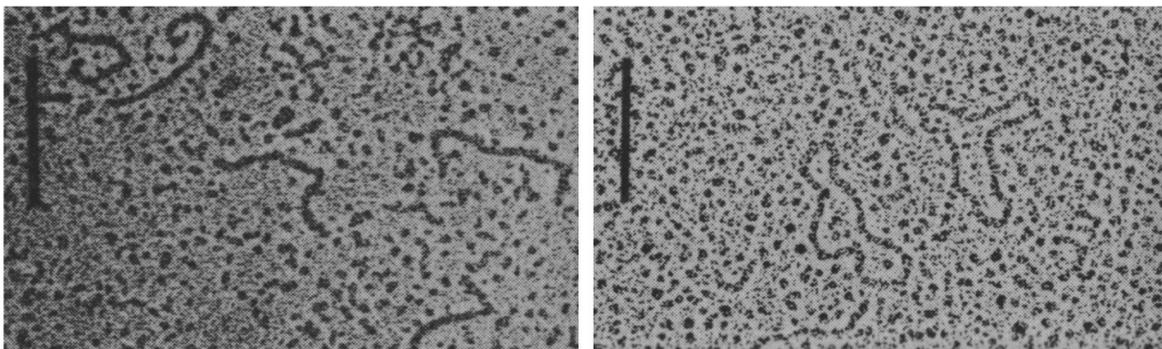
**Question 35.** Pourquoi observe-t-on une diagonale sur la figure 16A ?

**Question 36.** Que remarquez-vous à la figure 16B ? Comment interprétez-vous cette observation ? Explicité votre observation par un schéma de la structure du génome viral.



**Figure 16. Analyse bioinformatique par Dot-plot de la séquence du génome viral de HDV.** Principe de l'analyse par Dot-plot : pour analyser la similarité entre deux séquences (S1 et S2), chacune des séquences est découpée en fragments de séquences ("mots") chevauchants formés chacun de 13 nucléotides adjacents. Lorsqu'un "mot" de la séquence S1 dépasse un seuil de similarité avec un "mot" de la séquence S2, un point noir est tracé ayant pour abscisse la position du premier nucléotide du "mot" de S1 et pour ordonnée la position du premier nucléotide du "mot" de S2.  
**A**, Analyse de la séquence antigénomique contre elle-même.  
**B**, Analyse de la séquence antigénomique contre sa séquence complémentaire et inversée (séquence génomique). Les nombres en ordonnée correspondent aux positions nucléotidiques sur la séquence antigénomique.

Les acides nucléiques préparés à partir de virions ont été purifiés et préparés en conditions non dénaturantes ou dénaturantes, puis observés au microscope électronique (Figure 17).

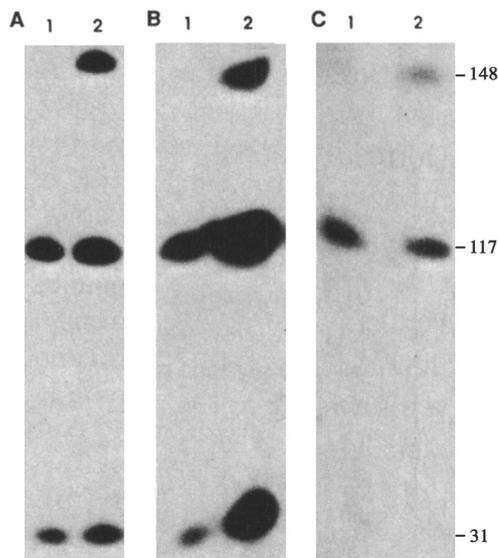


**Figure 17. Observation en microscopie électronique des acides nucléiques préparés à partir de virions de HDV.** **A**, Acides nucléiques préparés en conditions non dénaturantes. **B**, Acides nucléiques préparés en conditions dénaturantes. Barres d'échelle latérales : 200 nm.

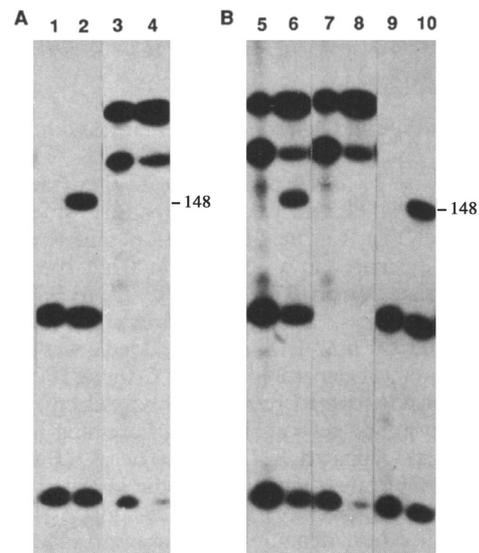
**Question 37.** *Comment interprétez-vous cette nouvelle observation ? Est-elle en accord avec vos conclusions précédentes ?*

## **B-2. Mécanisme de circularisation de l'ARN viral**

Un fragment d'ARN correspondant aux nucléotides 754 à 901 de HDV (fragment 1) a été produit par transcription *in vitro* en présence des 4 ribonucléotides triphosphates, d'UTP radioactif et de 12 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>. Les produits de la réaction sont mis à migrer sur un gel dénaturant (Figure 18A) soit immédiatement (piste 1), soit après une incubation de 10 minutes à 37°C en présence de 60 mmol.L<sup>-1</sup> d'EDTA, un agent chélatant spécifiquement les cations divalents (piste 2). L'ARN contenu dans la bande de 148 nucléotides de la piste 2 a été purifié à partir du gel, incubé à 37°C pendant 30 minutes en présence d'un tampon contenant 12 mmol.L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, puis redéposé sur gel (Figure 18B) soit immédiatement (piste 1), soit après une incubation supplémentaire de 10 minutes à 37°C en présence de 60 mmol.L<sup>-1</sup> d'EDTA (piste 2). Cette procédure a été répétée une autre fois (Figure 18C).



**Figure 18.** Analyse sur un gel de polyacrylamide en présence de 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée du fragment 1 produit par transcription *in vitro*. Les expériences analysées dans les parties A, B et C sont décrites dans le texte. Les tailles des fragments observés sont données à droite de la figure, en nucléotides. Dans l'analyse des résultats, on ne tiendra pas compte des différences d'intensité des bandes d'une piste à l'autre ou d'un gel à l'autre.



**Figure 19.** Analyse sur un gel de polyacrylamide en présence de 8 mol.L<sup>-1</sup> d'urée des fragments 1 et 2 produits par transcription *in vitro*. Les expériences analysées dans les parties A et B et les fragments 1 et 2 sont décrits dans le texte. Dans l'analyse des résultats, on ne tiendra pas compte des différences d'intensité des bandes d'une piste à l'autre ou d'un gel à l'autre.

**Question 38.** *Quelle est la taille attendue pour le fragment 1 ? Comment expliquez-vous alors le résultat obtenu en piste 1 de la figure 18A ? Quelles activités catalytiques la confrontation des résultats des pistes 1 et 2 permet-elle de mettre en évidence ?*

**Question 39.** *Analysez les résultats des figures 18B et 18C. Quelle est l'origine des activités catalytiques mises en évidence précédemment ?*

La même expérience a été réalisée en utilisant soit le fragment 1 seul (Figure 19A, pistes 1 et 2), soit le fragment 2 correspondant aux nucléotides 754 à 920 de HDV auquel a été lié en 3' un fragment de 55 nucléotides provenant d'une séquence étrangère (Figure 19A, pistes 3 et 4), soit en mélangeant les fragments 1 et 2 (Figure 19B, pistes 5 à 10). Dans les pistes 5 et 6 de la figure 19B, les fragments 1 et 2 sont radioactifs ; dans les pistes 7 et 8, seul le fragment 2 est radioactif ; dans les pistes 9 et 10, seul le fragment 1 est radioactif.

**Question 40.** *Comment expliquez-vous le fait que la bande inférieure migre à la même hauteur dans les quatre pistes de la figure 19A ? Indiquez par un schéma à quoi correspondent précisément les différents ARN observés sur ce gel.*

**Question 41.** En quoi les résultats obtenus aux pistes 6, 8 et 10 de la figure 19B sont-ils étonnants ? Comment les interprétez-vous ?

Des résultats identiques ont été obtenus en utilisant le fragment complémentaire et inversé du fragment 1.

**Question 42.** Qu'est-ce que cela signifie ?

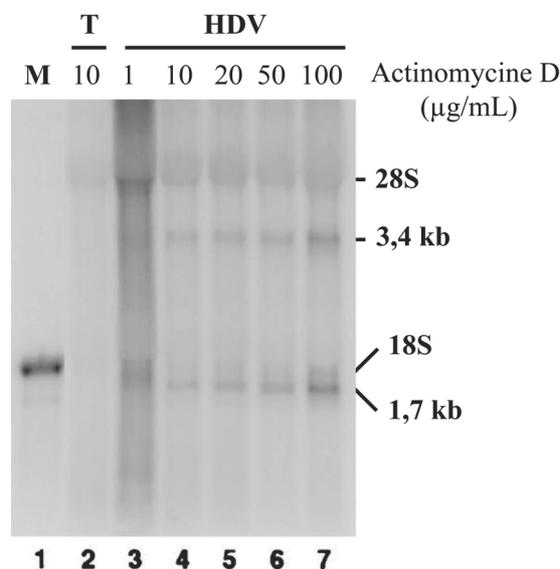
**Question 43.** En supposant que l'ensemble de ces résultats soient transposables aux conditions physiologiques cellulaires, quelles hypothèses suggèrent ces résultats expérimentaux concernant le mécanisme de circularisation du génome viral à partir des formes multimériques ?

### **B-3. Mécanisme de synthèse du génome viral**

Il a été montré que l'unique protéine codée par HDV, l'antigène  $\delta$ , ne possède pas d'activité intrinsèque ARN polymérase ARN-dépendante, ni d'activité ADN polymérase ARN-dépendante. Par ailleurs, les cellules animales ne possèdent aucune de ces deux activités qui soit capable de répliquer le génome de HDV. Enfin, le génome de HDV est capable de se répliquer dans les cellules hôtes en l'absence du virus HBV.

**Question 44.** En quoi ces informations posent-elles un problème théorique ?

Un ARN génomique de HDV de 1,9 kb synthétisé *in vitro* est introduit dans les cellules Huh7 avec l'ARN HDAg (voir l'expérience de la figure 15). Les cellules transfectées sont cultivées pendant 4 heures en présence de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate et de différentes concentrations d'actinomycine D, un agent s'intercalant dans l'ADN et inhibant toutes les polymérisations utilisant cette molécule comme matrice. Les ARN sont alors purifiés, mis à migrer sur un gel d'agarose et autoradiographiés (Figure 20).



**Figure 20.** Analyse des cellules Huh7 transfectées par l'ARN génomique de HDV et l'ARN HDAg, en présence d'actinomycine D. Les concentrations en actinomycine D sont indiquées au-dessus des pistes. M : marqueur de taille (molécules d'ADN linéaires). T : ARN de cellules Huh7 non transfectées. HDV : ARN de cellules Huh7 transfectées par l'ARN génomique de HDV et l'ARN HDAg. 18S et 28S : ARN ribosomiques 18S et 28S. kb : kilobases.

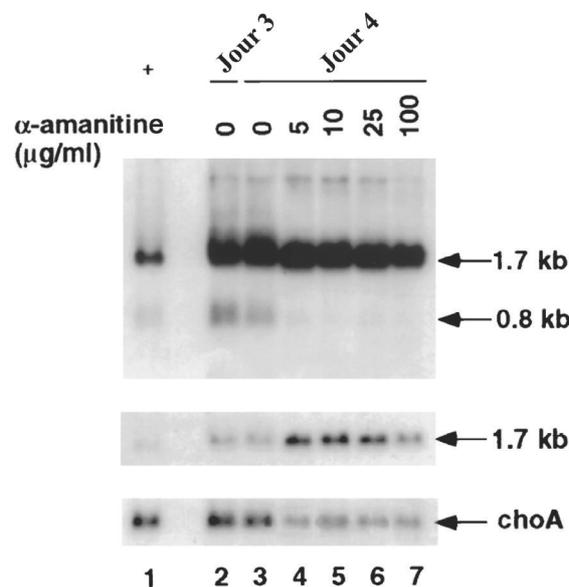
**Question 45.** Proposez une hypothèse qui explique l'augmentation de l'intensité des bandes à 1,7 kb et 3,4 kb avec la concentration en actinomycine D.

Les cellules eucaryotes possèdent trois ARN polymérase ADN-dépendantes, les ARN polymérase I, II et III (Pol I, Pol II, Pol III), qui peuvent être inhibées par une concentration appropriée en  $\alpha$ -amanitine. Seule la Pol II est couplée à la polyadénylation. Les caractéristiques des trois polymérase sont présentées à la Table 5.

ARN polymérase	ARN transcrits	couplage à la polyadénylation	localisation nucléaire	concentration inhibitrice en $\alpha$ -amanitine
Pol I	ARN ribosomiques 18S et 28S	non	nucléole	> 50 $\mu$ g/ml
Pol II	ARN messagers	oui	nucléoplasme	< 5 $\mu$ g/ml
Pol III	Petits ARN non transcrits (ARNt,...)	non	nucléoplasme nucléole	~ 20 $\mu$ g/ml

**Table 5. Principales caractéristiques des ARN polymérase eucaryotes.**

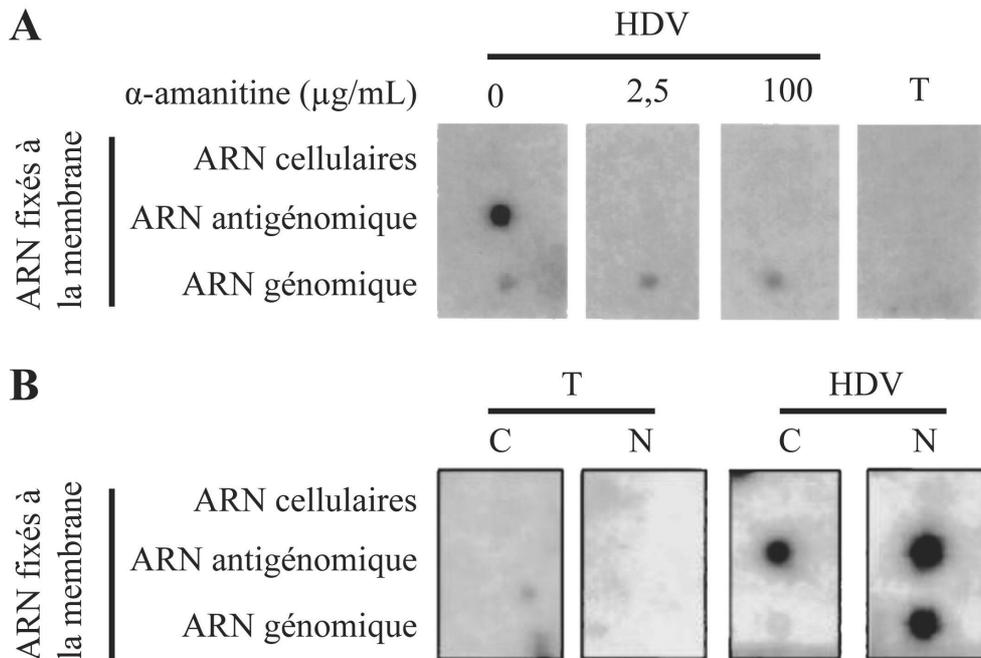
Les cellules Huh7 transfectées par l'ARN génomique de 1,9 kb de HDV et par l'ARN HDAg sont cultivées en l'absence d' $\alpha$ -amanitine pendant trois jours. Une partie des cellules est alors lysée (Figure 21, piste 2) tandis que l'autre partie est cultivée pendant 24 heures supplémentaires en présence de différentes concentrations en  $\alpha$ -amanitine (Figure 21, pistes 4 à 7). Les ARN sont purifiés, mis à migrer sur un gel d'agarose, transférés sur membrane de nitrocellulose puis hybridés avec une sonde oligonucléotidique radioactive reconnaissant l'ARN antigénomique de HDV. On précise que les ARN génomique et l'ARN HDAg dérivent de deux souches virales très divergentes et que l'oligonucléotide choisi ne reconnaît pas l'ARN HDAg initialement introduit. L'ARN messager du gène cellulaire choA est également analysé dans les mêmes conditions, mais à l'aide d'une sonde le reconnaissant.



**Figure 21. Analyse des cellules Huh7 transfectées par l'ARN génomique de HDV et l'ARN HDAg, en présence d' $\alpha$ -amanitine.** Le protocole expérimental est décrit dans le texte. La bande à 1,7 kb étant saturée dans la partie haute de la figure, une exposition plus faible est montrée dans la partie centrale. La partie basse montre le résultat de l'hybridation utilisant une sonde reconnaissant spécifiquement l'ARN messager choA. + : ARN viraux et cellulaires témoins, servant de marqueur de taille. Les concentrations en  $\alpha$ -amanitine utilisées sont indiquées au-dessus des pistes. kb : kilobases.

**Question 46.** Analysez les résultats obtenus avec l'ARN choA. Analysez et interprétez les résultats obtenus avec les ARN viraux. Compte tenu des propriétés des ARN polymérase cellulaires, en quoi ces résultats sont-ils surprenants ?

Les cellules Huh7 transfectées par l'ARN antigénomique de HDV de 1,9 kb et l'ARN HDAg sont maintenant cultivées en l'absence d' $\alpha$ -amanitine pendant 4 jours, puis incubées pendant 30 minutes en présence de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate et de différentes concentrations en  $\alpha$ -amanitine. Les ARN cellulaires sont alors purifiés, puis hybridés sur une membrane sur laquelle ont été préalablement fixés, sous forme de dépôts circulaires (dot-blot), des quantités identiques d'ARN de HDV froids (non radioactifs) s'hybridant avec le brin génomique ou le brin antigénomique de HDV (Figure 22A). La même expérience est réalisée en l'absence d' $\alpha$ -amanitine et en séparant les ARN cytoplasmiques des ARN nucléaires (Figure 22B).



**Figure 22.** Analyse des cellules Huh7 transfectées par l'ARN antigénomique de HDV et l'ARN HDAg, en présence (A) ou en absence (B) d' $\alpha$ -amanitine. Le protocole expérimental est décrit dans le texte. Les concentrations en  $\alpha$ -amanitine utilisées sont indiquées. Pour la figure 22B, les quantités d'ARN radioactifs cytoplasmiques et nucléaires utilisés sont différentes. **HDV** : ARN de cellules Huh7 transfectées par l'ARN antigénomique de HDV et l'ARN HDAg. **T** : ARN de cellules Huh7 non transfectées, cultivées 4 jours puis incubées en présence de  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate pendant 30 minutes. **ARN cellulaires** : fixation à la membrane d'ARN froids purifiés de cellules Huh7 non transfectées. **ARN antigénomique et ARN génomique** : fixation à la membrane d'ARN de HDV froids s'hybridant respectivement avec le brin génomique et le brin antigénomique de HDV. **C** : ARN cytoplasmiques. **N** : ARN nucléaires.

**Question 47.** Interprétez le témoin "ARN cellulaires" pour les cellules non transfectées ("T") puis pour les cellules transfectées par HDV.

**Question 48.** Analysez et interprétez les résultats obtenus à la figure 22A pour les ARN génomiques puis pour les ARN antigénomiques viraux.

**Question 49.** Analysez et interprétez les résultats obtenus à la figure 22B pour les ARN génomiques et antigénomiques viraux.

**Question 50.** A l'aide d'un schéma, récapitulez vos conclusions concernant les mécanismes de synthèse du génome viral.

Si l'on réalise les mêmes expériences que précédemment (expériences des figures 21 et 22) mais dans des conditions qui bloquent l'expression de l'antigène  $\delta$ , les ARN de 0,8 kb et les ARN génomique et antigénomique de 1,7 kb ne sont plus détectés.

***Question 51. Comment interprétez-vous ces résultats ? Selon vous, quel est le mode d'action de l'antigène  $\delta$  dans le processus de réplication et d'expression du virus HDV ?***

On a par ailleurs mis en évidence que de l'antigène  $\delta$  est également impliqué dans l'importation de l'ARN génomique dans le noyau cellulaire.

***Question 52. Compte tenu de cette information et des caractéristiques des différentes ARN polymérases (voir la table 5), comment expliquez-vous que l'ARN génomique puisse donner naissance simultanément à l'ARN de 0,8 kb et l'ARN antigénomique de 1,7 kb ?***

La polyadénylation d'un ARN consiste en un clivage de l'ARN en aval d'une séquence signal (séquence AATAAA) et en l'addition au niveau de l'extrémité 3' ainsi générée d'une queue polyA. Ce processus n'est possible que si l'ARN est synthétisé par la Pol II et que s'il possède la séquence AATAAA.

***Question 53. Comment expliquez-vous alors que ni l'ARN génomique ni l'ARN antigénomique ne soient polyadénylés alors que l'ARN de 0,8 kb l'est ?***

**Fin de l'épreuve**