

Objectifs du module

Dans ce chapitre, certaines infections virales ont été détaillées, comme exemples d'un type de travail qui peut être fait. Nous encourageons les étudiants à développer de tels travaux pour des virus choisis.

Table des matières

- 1. Sida**
- 2. Grippe**
- 3. TMV**
- 4. Phages**
- 5. Papillomavirus**
- 6. Picorna**
- 7. Bibliographie**

Prérequis

Pour aborder ce chapitre, les étudiants auront bien assimilé les chapitre I à IV du présent site.

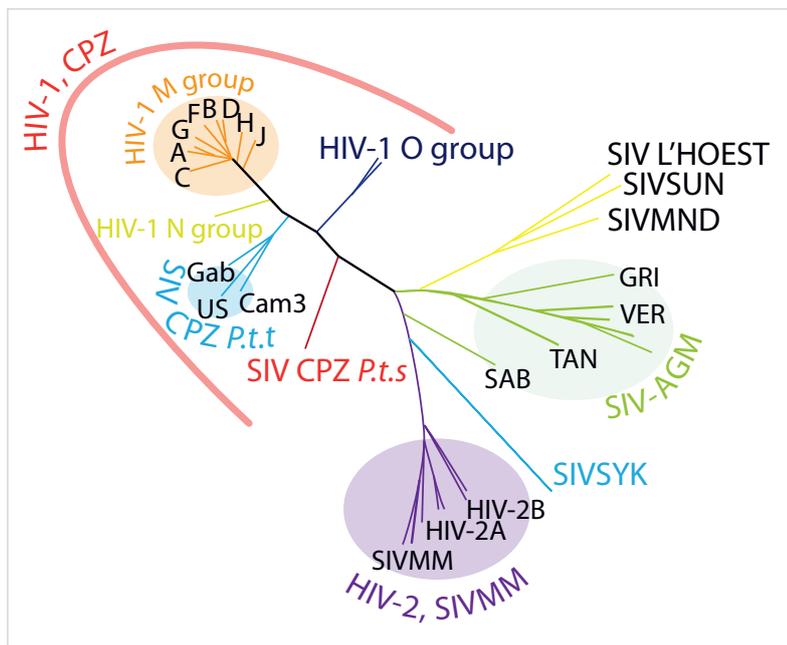
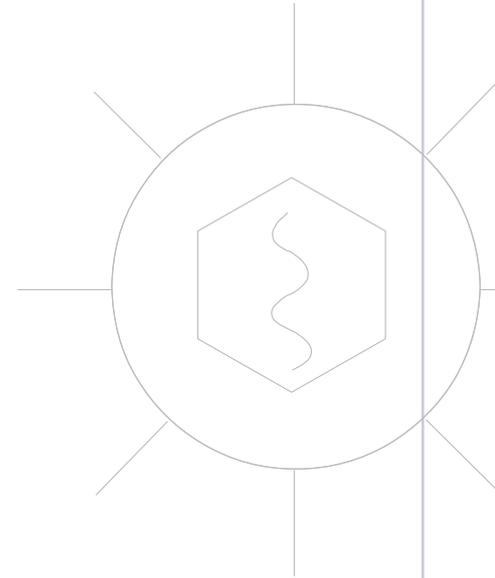
V. Exemples choisis

1. Virus du sida

Le SIDA a été découvert en 1981 en Californie à la suite d'une épidémie rare d'infection pulmonaire par *Pneumocystis carinii* (actuellement *Pneumocystis jirovecii*) chez des hommes homosexuels qui semblaient en bonne santé auparavant. En 1983 le virus sera identifié par les français Luc Montagnier et Françoise Barré-Sinoussi, et nommé LAV (lymphadenopathy associated virus), tandis que le groupe de Robert Gallo persistera à utiliser le nom HTLV-III. Un accord franco-américain permettra de s'entendre sur le nom Human Immunodeficiency Virus (HIV ou VIH en français).

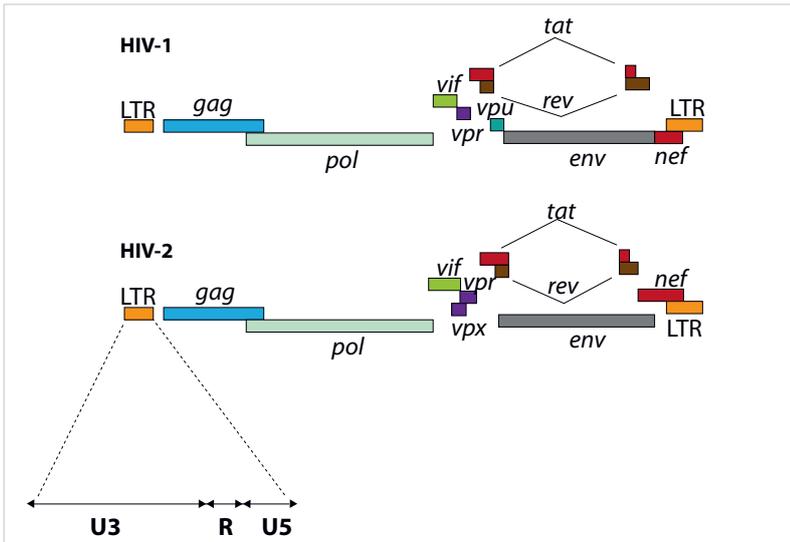
Virus

Les virus qui causent le syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA appartiennent à la famille des **Retroviridae**, genre Lentivirus. Il existe 2 types de virus de l'immunodéficience humaine (VIH): VIH-1 et VIH-2. Ils ont globalement 42 % d'identité génétique. Les deux virus sont en outre classés en nombreux groupes et sous-types. Le groupe principal parmi les VIH-1 est le groupe M, qui a évolué vers de nombreux sous-types et types recombinants. Les lentivirus sont des **virus** enveloppés, possédant 2 molécules d'ARN monocaténaire identiques (le virus est diploïde) associées à l'enzyme polymérase, transcriptase inverse ou 'Reverse Transcriptase' (RT), qui copie l'ARN viral en ADN double brin. L'ADN double brin est ensuite intégré dans le génome cellulaire, via une seconde enzyme, l'intégrase. L'ADN viral intégré dans le génome cellulaire porte le nom de "provirus". Le génome des virus VIH-1 et VIH-2 a la structure générale du génome des retrovirus : le provirus (voir plus loin) est flanqué par deux zones répétitives, les LTR (long terminal repeat), il possède les gènes structuraux *gag* (« group antigen »), *pol* (« polymerase ») et *env* (« envelope »), ainsi qu'un certain nombre de gènes codant pour des protéines non-structurales, les plus importantes étant Tat et Rev.

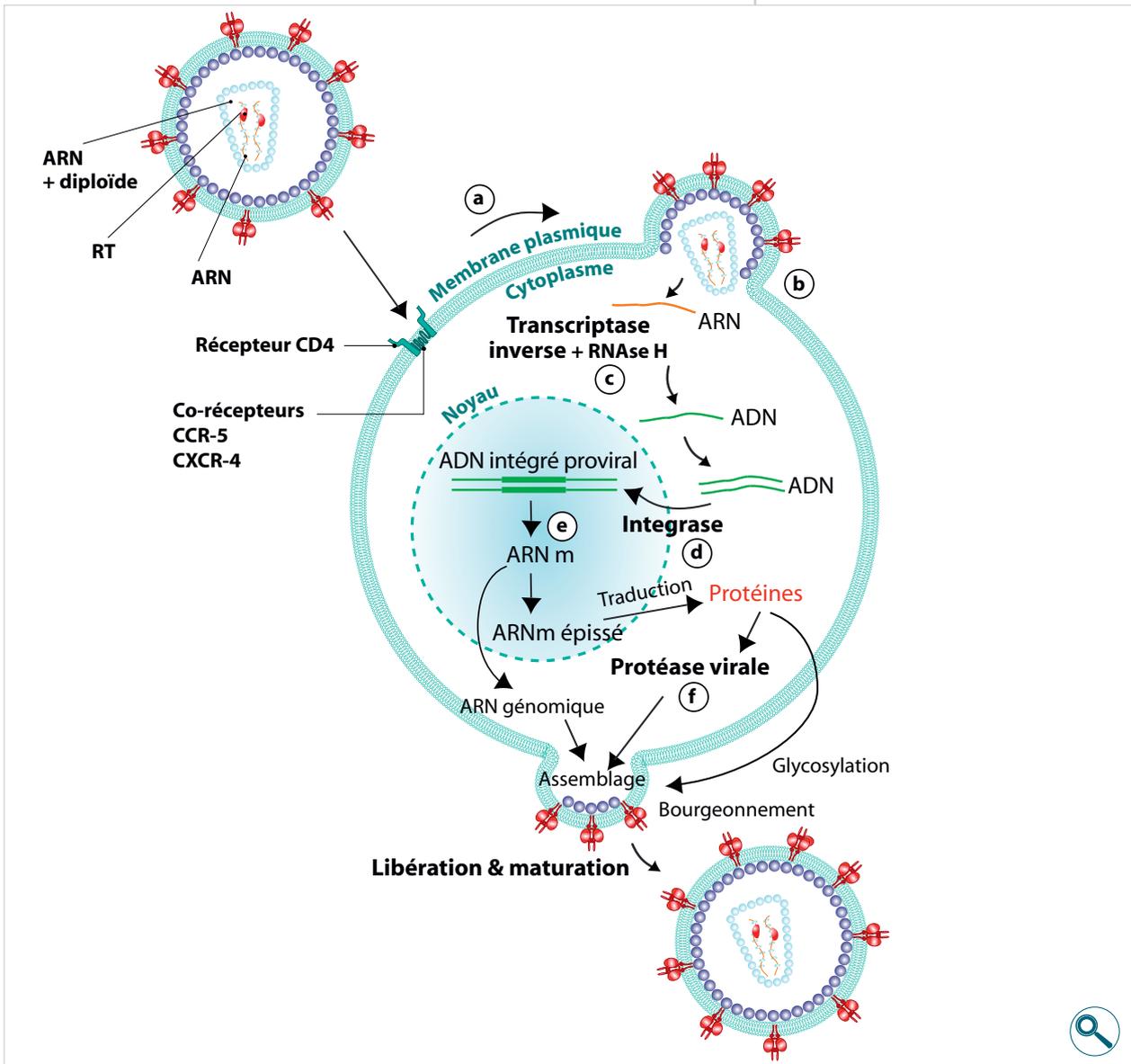


V.1.1. Arbre phylogénétique
Cette figure illustre le fait que les virus VIH-1 et VIH-2 ont des origines mêlées à celles des SIV simiens et forment plusieurs groupes. Cela indique qu'ils sont issus de plusieurs transmissions du singe à l'homme. Le groupe le plus important du VIH-1, responsable de la pandémie actuelle, est le groupe M. Celui-ci s'est divisé en de multiples sous-types au cours de l'évolution chez l'homme. Le sous-type dominant aux EU et en Europe est le sous-type B, bien qu'en Belgique de nombreux sous-types soient présents. Les différents sous-types ont donné naissance à des formes recombinantes appelées CRF (circulating recombinant forms). Le VIH-2 est issu de deux transmissions indépendantes à partir d'un foyer simien, donnant les groupes A (le plus commun) et B.

V. Exemples choisis > 1. Virus du sida

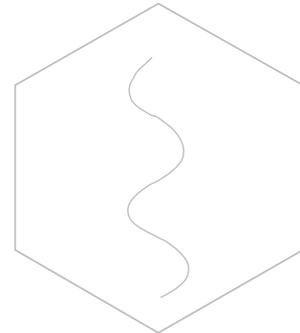


V.1.2. Structure du génome pro-viral



V.1.3. Cycle viral du VIH
 Pour obtenir les schémas détaillés des différentes étapes:
[\[http://www.virologie-uclouvain.be\]](http://www.virologie-uclouvain.be)

Le récepteur principal des VIH est la molécule CD4, présente à la surface de certains lymphocytes T, de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques. Ces virus reconnaissent également des récepteurs accessoires CCR5 et CXCR4, qui sont des récepteurs de chimiokines. La liaison avec ces récepteurs va permettre la fusion entre la membrane du virus (l'enveloppe) et la membrane cellulaire. Au début de l'infection, ce seront surtout les virus reconnaissant le CCR5 (virus R5) qui seront présents. Ils sont capables de reconnaître préférentiellement les macrophages et les cellules dendritiques, ainsi que certaines populations de lymphocytes comme les lymphocytes mémoires. Les virus reconnaissant le CXCR4 (virus X4), qui sont essentiellement lymphotropes, apparaissent plus tard lorsque l'infection évolue vers le SIDA. Ces virus X4 induisent des syncytia dans certaines lignées cellulaires et furent appelés « syncytium inducing » (SI). Il existe des virus reconnaissant les deux types de corécepteurs. Ces virus sont appelés R5/X4. Les VIH ont comme caractéristiques essentielles de détruire les cellules qu'ils infectent, de posséder un grand nombre de gènes régulateurs et de présenter une très grande variabilité génétique. Ils se présentent comme **quasi-espèce** chez les personnes infectées.

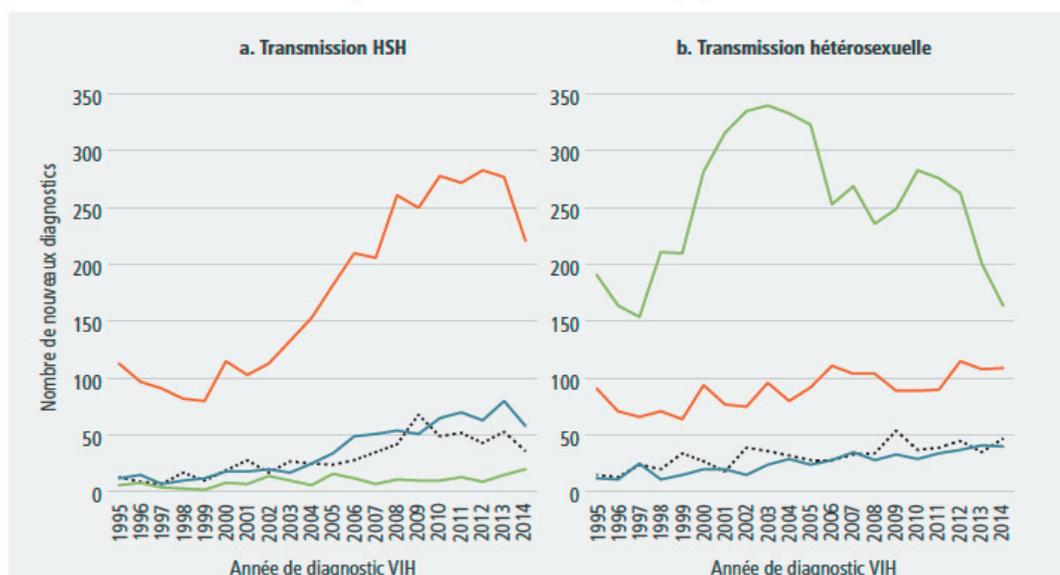


Epidémiologie

<http://www.who.int/hiv/fr/>

Les VIH sont transmis par le sang et ses dérivés, par contact sexuel et par passage de la **mère à l'enfant**. Le VIH-1 a une diffusion mondiale et le VIH-2 une diffusion surtout restreinte à l'Afrique de l'Ouest. Dans les pays occidentaux les groupes les plus exposés sont les homo- et bisexuels masculins et les toxicomanes par voie intraveineuse, ainsi que les migrants provenant d'Afrique sub-saharienne. Dans les pays en voie de développement, la transmission hétérosexuelle est dominante. La Belgique connaît une situation intermédiaire, où la transmission homosexuelle est devenue la plus fréquente (voir figure V.1.4 et rapport de l'institut scientifique de santé publique à www.wiv-isp.be). Bien que l'incidence du VIH tend aujourd'hui à diminuer, la prévalence de l'infection augmente car l'espérance de vie des patients infectés a augmenté

Figure 6 | Évolution du nombre annuel de nouveaux diagnostics d'infection VIH, par modes de contamination probable et nationalités, Belgique, 1995-2014



V.1.4. Evolution des diagnostics VIH des patients par mode probable de transmission et nationalité (1997-2014) - Source : l'ISP en novembre 2015. HSH = hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes

grâce aux traitements. Malgré ces avancées thérapeutiques, le dépistage reste problématique : on estime qu'à l'échelle mondiale, plus de 45% des personnes infectées ne connaissent pas leur statut. En Belgique, ce chiffre est proche de 20%.

Les pays en voie de développement sont de loin les plus touchés. L'allaitement maternel peut permettre la transmission du VIH. Il semble cependant que celle-ci serait plus importante lors d'un allaitement mixte (maternel/artificiel) et que l'allaitement mixte favorise la survenue de diverses autres maladies infectieuses. Pour cette raison il est actuellement admis que dans les circonstances d'un pays en voie de développement il faut recommander un allaitement maternel intégral pendant les 6 premiers mois de vie, si il est accompagné d'un traitement antirétroviral efficace. Le traitement de la mère dans cette période réduit fortement la transmission.

Infection humaine

► Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Les VIH sont responsables d'un syndrome qui se caractérise par la disparition lente et inéluctable des Lymphocytes CD4+, aboutissant au SIDA ou syndrome d'immunodéficience acquise, dont la durée d'incubation naturelle moyenne est estimée à 8 ans. La durée d'incubation est actuellement fort prolongée grâce au traitement.

La primo-infection passe souvent inaperçue. Dans 30 % des cas elle s'accompagne d'un syndrome clinique s'accompagnant de fièvre ou d'une maladie ressemblant à la mononucléose infectieuse. Les anticorps apparaissent de 3 à 12 semaines après l'infection.

Fréquence typique des différents symptômes lors d'une primo-infection symptomatique

<i>Fièvre</i>	96%
<i>Adénopathie</i>	74%
<i>Pharyngite</i>	70%
<i>Exanthème</i>	70%
<i>Myalgie</i>	54%
<i>Diarrhée</i>	32%
<i>Mal de tête</i>	32%
<i>Nausées et vomissements</i>	27%
<i>Hépto-splénomégalie</i>	14%
<i>Perte de poids</i>	13%
<i>Muguet</i>	12%
<i>Symptômes neurologiques</i>	12%

Ensuite s'installe un état de portage asymptomatique. Une variété de symptômes vont survenir après un temps variable et traduire la détérioration clinique et l'immunodépression (dans le temps, ceci était appelé « AIDS related complex » ou ARC) : diarrhée, fièvre, amaigrissement, lymphadénopathies. La survenue d'infections opportunistes, du sarcome de Kaposi ou d'autres tumeurs malignes, indiquant une diminution des défenses immunitaires, signe l'entrée dans le SIDA. Ceci correspond au stade C du CDC américain (tableau 2 des pathologies apparaissant à la demande).

Tableau 1: maladies indiquant un stade CDC B incluent toute maladie en rapport avec l'infection HIV, non incluse dans la définition du stade C.

Exemples les plus fréquents mais non limitatifs

Angiomatose bacillaire
Candidiase oro-pharyngée (muguet)
Candidose vulvo-vaginale persistante répondant mal au traitement
Dysplasie cervicale ou carcinome in situ
Symptômes constitutionnels (tels que fièvre ou diarrhée) persistant plus d'un mois
Leucoplasie chevelue linguale
Deux poussées de zona ou zona affectant plus de deux dermatomes
Purpura thrombocytopénique idiopathique
Listériose
Abscess pelvien
Neuropathie périphérique

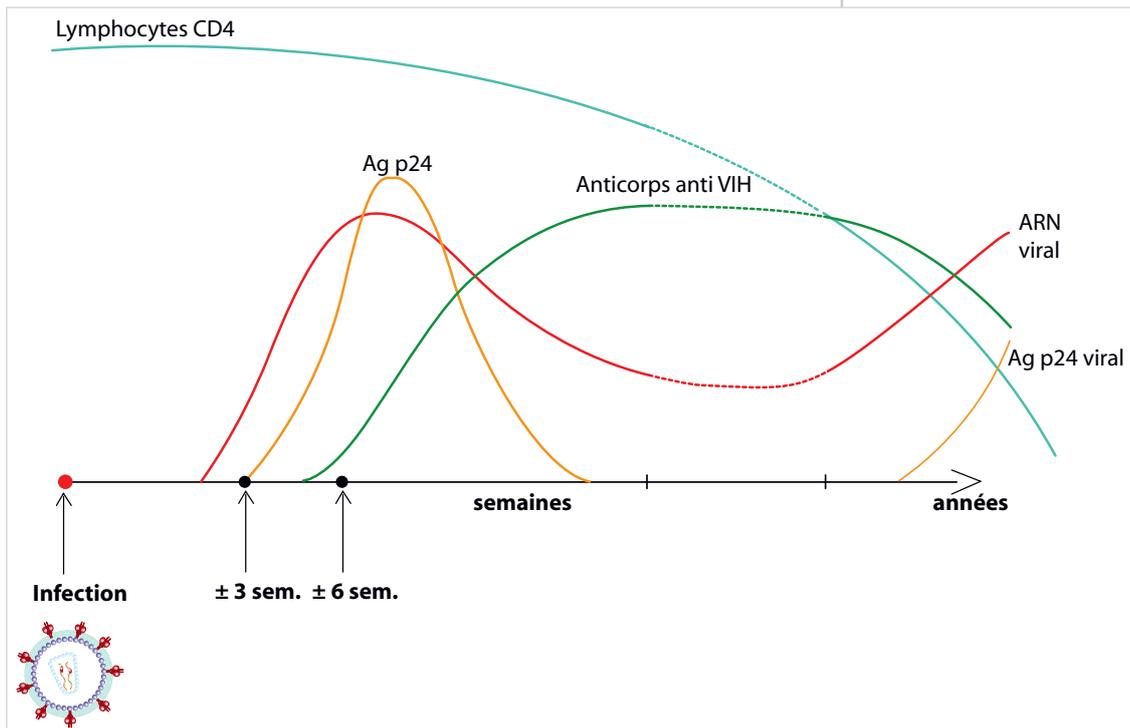
D'autres pathologies, non indicatives du SIDA, peuvent survenir tels des dysplasies cervicales, des épisodes de zona ou une candidose buccale: elles signent le stade B. (tableau 1 des pathologies apparaissant à la demande).

Classification des cas d'infection par VIH			
	Catégories cliniques (cases grisées : indication de traitement spécifique anti-VIH)		
	A	B	C*
Nombre de lymphocytes CD4	Asymptomatique	Symptomatique	Maladie indicative de SIDA
	Lymphadénopathie	(ni A ni C)	
	Infection aiguë VIH	Voir tableau 1	Voir tableau 2
> 500/mm ³	A1	B1	C1
> 200 à 499/mm ³	A2	B2	C2
> 200/mm ³	A3	B3	C3

*Un patient entrant dans le stade C y restera même après guérison de sa maladie indicative de SIDA.

Tableau 2 : maladies définissant le stade CDC C (si liées à la présence du VIH ou compliquées par la présence de celui-ci).

Candidiase des bronches, trachée, poumons ou œsophage
 Cancer cervical invasif
 Coccidioidomycose disséminée ou extra-pulmonaire
 Cryptococcose extrapulmonaire
 Rétinite par cytomégalovirus
 Infection par cytomégalovirus affectant d'autres organes que le foie, la rate ou les ganglions
 Encéphalopathie liée au VIH ou au virus JC
 Infection chronique par le virus herpès simplex ou atteinte d'organe
 Histoplasmose, disséminée ou extrapulmonaire
 Isosporiase intestinale chronique
 Sarcome de Kaposi (virus herpès humain de type 8)
 Lymphome cérébral primaire, Lymphome immunoblastique et lymphome de Burkitt
 Infection par mycobactéries atypiques disséminée ou extrapulmonaire
 Infection par M. tuberculosis
 Pneumonie par Pneumocystis jirovecii
 Pneumonies récurrentes
 Septicémies à Salmonella récidivantes
 Toxoplasmose cérébrale



V.1.5. Evolution de l'infection.

A peu près 3 semaines après une infection apparaît l'antigène p24 (Ag p24) dans le sang, précédé de quelques jours de l'ARN viral. Les anticorps sont généralement présents endéans les 6 semaines. Après la phase aiguë il y a une longue phase de latence clinique, accompagnée d'une persistance de l'ARN viral, dont la concentration (charge virale) descend à un plateau plus faible qu'en phase aiguë, pour augmenter à nouveau lorsque l'évolution vers les manifestations cliniques se fait. L'antigène, détectable au début, devient indétectable ensuite pour réapparaître vers la fin. Les anticorps sont le signe d'infection le plus constant et le plus facilement décelable, par exemple par ELISA ; ils sont présents à vie. Au cours de l'évolution il y a une diminution progressive du taux de lymphocytes CD4+.

Sans traitement, les effets physiopathologiques les plus marquants de l'infection par le VIH sont liés à l'immunodéficience, le stade SIDA entraînant la mort du patient. Depuis la disponibilité de traitements efficaces, l'espérance de vie prolongée a rendu possible l'observations de manifestations pathologiques non-liées au SIDA. Ces phénomènes sont responsables d'une mortalité précoce des patients positifs par rapport à la population générale, même si un traitement antirétroviral efficace est administré.

L'infection VIH va perturber l'organisation des tissus lymphoïdes, particulièrement au niveau des muqueuses. La déplétion du nombre de lymphocytes T va entraîner une modification de l'architecture tissulaire, et une perturbation de l'équilibre entre les populations cellulaires régulant la réponse inflammatoire. En conséquence, le patient infecté se trouvera dans un état d'activation chronique du système immunitaire, favorisant la réponse inflammatoire par libération de cytokines. La présence de marqueurs biologiques de l'inflammation dans le sérum sont augmentés, et on note la présence de LPS, endotoxine bactérienne : au niveau de la muqueuse digestive, la translocation de bactéries de la flore commensale digestive au travers de l'épithélium perturbé favorise aussi la réponse inflammatoire.

Cet état va augmenter la survenue de complications métaboliques, incluant un risque accru d'accidents cardio-vasculaires, de diabète, d'insuffisance rénale et hépatique, d'ostéoporose et de troubles neurologiques. Le développement de cancers, non-liés au stade SIDA, est également plus fréquent.

De façon générale, l'inflammation chronique aura pour effet sur le patient un vieillissement prématuré, comme l'attestent la présence de marqueurs de sénescence. Ce concept est repris sous le terme anglo-saxon "d'inflammaging".

Diagnostic au laboratoire

Chez l'adulte, le diagnostic est sérologique et nécessite un test de dépistage (généralement ELISA) pour la recherche des anticorps puis un test de confirmation (type Western Blot). Le test est généralement positif dans les 3 à 6 semaines suivant une contamination et certainement dans les 3 mois. La détection de l'antigène p24 libre circulant dans le plasma ou le sérum peut être intéressante en cas de suspicion de primo-infection. Actuellement les tests de dépistage de 4^{ème} génération combinent la recherche d'anticorps et d'antigène p24. Ceci permet un résultat positif dans les deux à trois semaines. L'ARN viral plasmatique est le premier marqueur biologique détectable lors d'une primo-infection, il peut également être utile en cas de suspicion de primo-infection.

La détection, par PCR, d'ADN proviral intégré dans les cellules mononucléées du sang (lymphocytes et monocytes) est une technique très sensible et spécifique. Une application importante du dépistage des provirus par PCR est le diagnostic chez l'enfant. En effet, celui-ci peut avoir des anticorps maternels jusqu'à 15 mois, compliquant la détection sérologique de l'infection.

La quantification d'ARN viral (on parle de charge virale) par **RT-PCR** dans le plasma permet de suivre les patients sous traitement, et d'évaluer le risque de progression et de transmission.

Il est également possible de rechercher la résistance du VIH aux produits antiviraux ; la technique la plus utilisée dans ce cadre est le génotypage : par définition de la séquence nucléotidique codant pour les protéines cibles (transcriptase inverse, protéase, intégrase) on recherche des mutations entraînant la résistance. Le suivi régulier de la concentration en lymphocytes CD4+ permet d'évaluer l'état du système immunitaire du patient.

En Belgique, il existe un système de laboratoire de référence SIDA (LRS). De tels LRS sont chargés de confirmer tous les diagnostics positifs effectués par les autres laboratoires. Cette confirmation est absolument nécessaire car la **valeur prédictive** est relativement faible dans notre population, à cause de la faible prévalence, et l'importance du diagnostic nécessite une sûreté absolue. Lorsqu'un patient est trouvé positif et que cela a été confirmé par un LRS, il est impératif de répéter le test sur un échantillon de sang indépendant avant d'en aviser le patient, ceci afin d'éviter toute erreur administrative ou expérimentale. Les LRS sont également chargés d'effectuer les tests de suivi (charges virales et génotypes).

Des tests rapides, basés sur la recherche d'anticorps dans la salive ou dans une goutte de sang, peuvent être effectués en quelques minutes. Certains sont disponibles en "auto-test" réalisé par le patient. Leur sensibilité reste plus faible que les tests ELISA de 4^e génération : leur interprétation correcte peut nécessiter des tests complémentaires en laboratoire.

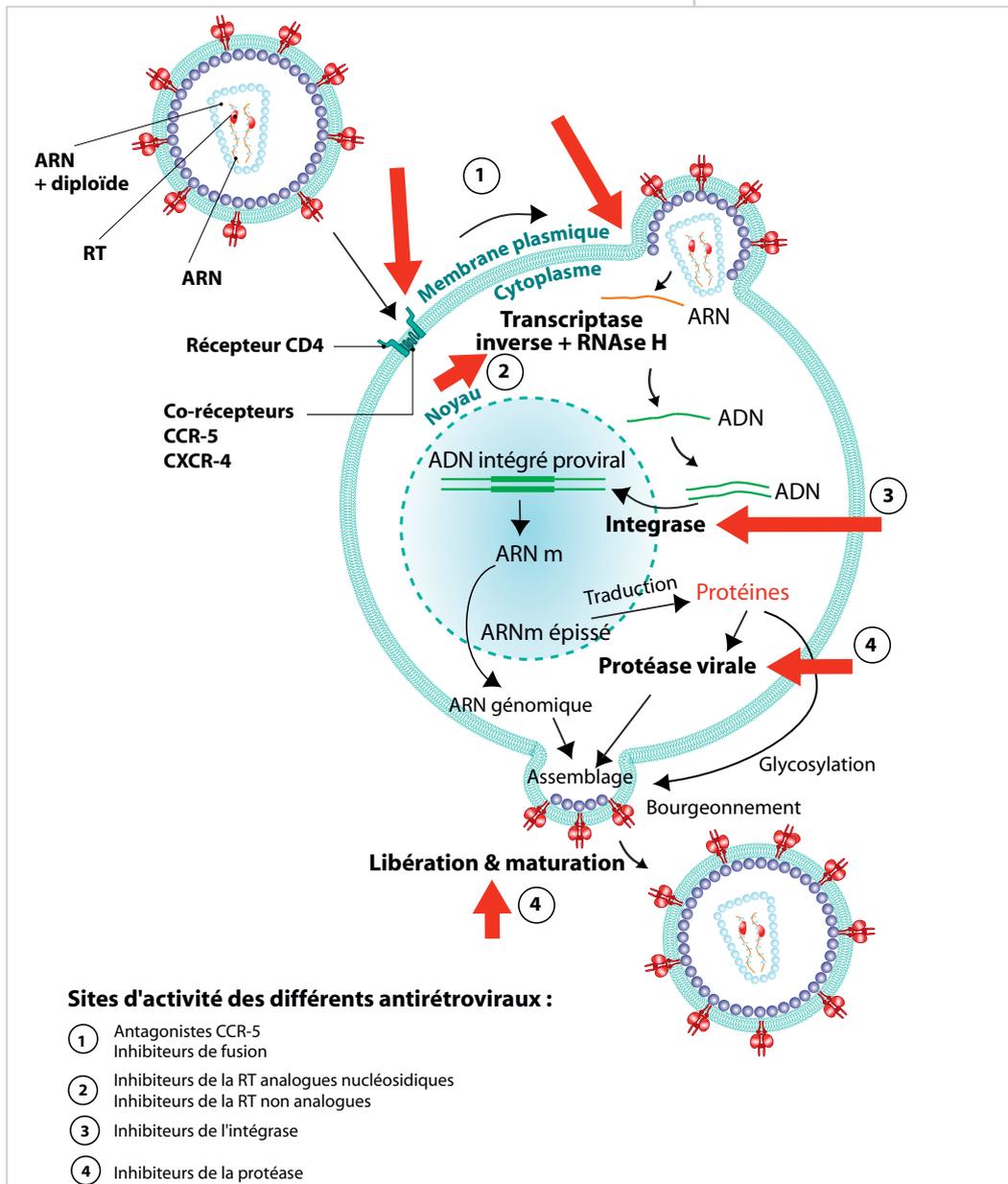
Prévention

Les mesures préventives prises contre la **transmission iatrogène** comprennent la détection des anticorps chez les donneurs de sang, de sperme et d'organe, et l'inactivation des pools plasmatiques utilisés pour la préparation des dérivés sanguins. La prévention de la transmission sexuelle implique plusieurs approches, dont la promotion des préservatifs et de la fidélité à un partenaire sain. Pour être efficaces, ces mesures doivent être incluses dans une éducation à la santé. Les différentes personnes devraient avoir connaissance de leur statut VIH (infecté ou non) en cas de comportement à risque présent ou ancien. La large disponibilité

de tests de dépistage, que nous connaissons en Belgique, rend cela facile. Même si le nombre de tests de dépistage effectués est élevé comparé à d'autres pays, environ 20% des personnes infectées ignorent leur positivité. Pour empêcher la transmission de la mère à l'enfant, l'essentiel est de traiter la mère pour diminuer sa charge virale. Le développement d'un vaccin est en cours d'étude, avec peu de résultats pour l'instant. Le traitement antirétroviral est envisagé comme moyen de prévention à 3 niveaux différents.

- Prophylaxie pré-exposition : l'administration de médicaments chez le patient négatif à risque de contracter le virus permet de réduire le taux de transmission ;
- Prophylaxie post-exposition : en cas d'exposition accidentelle au virus, par exemple lors d'accidents de travail du personnel médical, un traitement est instauré pendant un mois afin de diminuer au maximum le risque de contamination ;
- A l'échelle globale, le risque de transmission sexuelle est fortement diminué si la réplication virale est bloquée. En plus des bénéfices pour le patient, la mise sous traitement du plus grand nombre possible est aujourd'hui utilisée pour aider à enrayer l'épidémie.

Traitement



Médicaments anti-VIH actuellement disponibles en Belgique

	Nom générique	Nom commercial	Abréviation
Analogues de nucléosides inhibiteurs de la transcriptase inverse (NRTI) 2	Abacavir	Ziagen®	ABC
	Didanosine (enteric coated)	Videx® et Videx EC®	ddl
	Lamivudine	Epivir®	3TC
	Stavudine	Zerit®	d4T
	Zidovudine	Retrovir®	ZDV (AZT)
	Zidovudine + lamivudine	Combivir®	ZDV + 3TC
	Zidovudine + lamivudine + abacavir	Trizivir®	ZDV+3TC+ABC
	Abacavir + lamivudine	Kivexa®	ABV+3TC
	Emtricitabine	Emtriva®	FTC
Analogues de nucléotide (NtRTI) 2	Tenofovir disoproxil fumarate	Viread®	TDF
	Tenofovir alafenamide*	/	TAF
Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI) 2	Efavirenz	Stocrin®	EFV
	Nevirapine	Viramune®	NVP
	Etravirine	Intelence®	ETV
	Rilpivirine	Edurant®	RPV
Inhibiteurs de la protéase (PI) 4	Saquinavir	Invirase®	SQV
	Indinavir	Crixivan®	IDV
	Lopinavir/Ritonavir	Kaletra®	LPV/r
	Fos-amprenavir	Telzir®	FPV
	Atazanavir	Reyataz®	ATV
	Tipranavir	Aptivus®	TPV
	Darunavir	Prezista®	DRV
	Darunavir + Cobicistat	Rezolsta®	DRV+COBI
Inhibiteur de fusion 1	Enfuvirtide	Fuzeon®	T20
Antagoniste du CCR-5 1	Maraviroc	Celsentri®	MVC
Inhibiteur de l'intégrase 3	Raltegravir	Isentress®	RAL
	Elvitegravir		EVG
	Dolutegravir	Tivicay®	DTG
Combinaison de produits de différentes classes	Tenofovir + emtricitabine	Truvada®	TDF + FTC
	Tenovovir + Emtricitabine + Efavirenz	Atripla®	TDF+FTC+EFV
	Tenofovir + Emtricitabine + Rilpivirine	Eviplera®	TDF+FTC+RPV
	Tenofovir + Emtricitabine + Elvitegravir + Cobicistat	Stribild®	TDF+FTC+EVG+COBI
	Abacavir + Lamivudine + Dolutegravir	Triumeq®	ABC + 3TC + DTG
	Abacavir + Lamivudine + Dolutegravir	Triumeq®	ABC+3TC+DTG
"Booster" pharmacocinétique	Ritonavir	Norvir®	RTV ou /r
	Cobicistat	Tyboost®	COBI

* en développement avancé, mise sur le marché future probable. Ces molécules notées * n'ont pas encore de nom commercial.

Historiquement, la première approche utilisée dans le traitement de l'infection par le virus du SIDA a été le développement de molécules capables d'interférer avec le fonctionnement de la transcriptase inverse, une enzyme nécessaire pour la réplication virale, absente des cellules non-infectées.

L'AZT ou Zidovudine, inhibiteur de la RT, est la première molécule ayant démontré son efficacité, en allongeant la durée de survie des patients atteints de SIDA. Il s'agit d'un **analogue de nucléoside**. (Note : des antiviraux actifs sur d'autres familles de virus possèdent également une structure de nucléoside). Ensuite d'autres inhibiteurs nucléosidiques de la RT (NRTI) ont été développés, suivis d'inhibiteurs non nucléosidiques de la RT (NNRTI) et d'inhibiteurs de la protéase (PI). Un cas particulier est le tenofovir, un analogue de nucléotide (NtRTI), qui est un phosphonate, mimant un ribose monophosphate. Les PI s'utilisent en association avec le ritonavir ou la cobicistat, boosters pharmacocinétiques qui permettent d'optimiser les taux plasmatiques du médicament. En 2003 un inhibiteur de la fusion des membranes par interférence avec la glycoprotéine transmembranaire du virus est entré en pratique clinique (T20 ou Fuzeon®). Ce produit n'est pratiquement plus utilisé car il n'existe que sous forme injectable à administrer deux fois par jour. Une autre approche actuelle est l'utilisation de produits bloquant le co-récepteur nécessaire à la fusion des membranes, le CCR5. L'utilisation de ce dernier produit est limitée à l'inhibition des virus R5. La dernière approche ayant mené à de nouveaux médicaments, est le blocage de l'**intégrase**, enzyme nécessaire à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN chromosomique de la cellule. Les inhibiteurs de l'intégrase (INI) utilisés actuellement en clinique sont des inhibiteurs du transfert de brins (Fig. V.1.6). Dans le traitement actuel, on associe d'emblée 3 ou 4 antiviraux (Highly Active AntiRetroviral Therapy = HAART ; ou combined AntiRetroviral Treatment = cART). La combinaison de départ inclut toujours deux NRTI (ou NtRTI) associés à un INI, ou associé à RPV (NNRTI) ou DRV (PI).

► Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Le traitement antirétroviral va permettre l'arrêt de la réplication virale, qui sera matérialisé par une charge virale indétectable dans les prélèvements sanguins. En conséquence, le système immunitaire du patient va pouvoir se reconstituer, ce qui se mesurera en clinique par une hausse progressive du nombre de lymphocytes CD4 circulants.

Néanmoins, plusieurs difficultés sont liées au traitement :

- des effets secondaires toxiques sont liés à l'usage de ces molécules, entraînant parfois des complications métaboliques ou neurologiques, ainsi que nombreuses interactions médicamenteuses;
- l'adhérence du patient au traitement doit être maximale si on veut maintenir l'absence de réplication virale, adhérence qui peut être compromise par les effets secondaires ou le nombre important de médicaments à prendre chaque jour;
- des souches virales résistantes aux antirétroviraux vont apparaître : lorsqu'un virus se réplique en présence d'un traitement qui ne serait pas parfaitement efficace ou imparfaitement suivi, on assiste à une sélection des souches résistantes.

Les nouvelles molécules ont permis aujourd'hui de réduire les toxicités, de réduire le nombre de prises par jour, et elles ont été conçues de telle sorte qu'elles soient actives sur les souches résistantes aux médicaments de première génération. Mais comme le traitement du VIH est devenu efficace pour contrôler la maladie

sur le long terme, le problème clinique de beaucoup de patients est dorénavant dominé par les effets secondaires du traitement administré à vie, la gestion des complications métaboliques liées à l'infection, et par la co-évolution d'une infection chronique concomitante telle l'hépatite B ou l'hépatite C. La survenue des complications définies plus haut restent donc d'actualité, même avec les traitements les plus récents.

Les recommandations d'usage en Europe pour l'instauration d'un traitement antirétroviral, et la gestion de ses complications, sont disponibles sur le site www.eacsociety.org à la rubrique "guidelines". Depuis 2015, il existe un consensus international pour recommander le traitement à tous les patients, quelque soit le stade d'évolution de l'infection ou le taux de CD4 sanguin. Le traitement est envisagé dès que la patient descend sous le seuil de 500 CD4/mm³ ou si d'autres circonstances cliniques l'exigent (grossesse, hépatite virale chronique par exemple).

Chez la femme enceinte séropositive VIH, le traitement administré à partir du deuxième trimestre de la grossesse diminue fortement la probabilité de transmission du virus à l'enfant. Si la charge virale plasmatique de la mère est indétectable, c'est-à-dire que la réplication du virus est parfaitement contrôlée par le traitement, le risque de transmission se rapproche de 0 contre 30% environ sans traitement.

A titre prophylactique, un enfant né de mère séropositive sera traité durant le premier mois de sa vie.

Chez l'enfant infecté, les recommandations varient suivant les groupes d'experts et les moyens disponibles mais le traitement se fera habituellement d'emblée avant l'âge de un an. Le nombre de combinaisons médicamenteuses possibles est plus réduit par rapport à l'adulte, essentiellement parce que peu d'études cliniques ont été réalisées chez l'enfant, et par manque de formulations appropriées (dosage adéquat, formulation en sirop, palatabilité).

Des souches résistantes peuvent apparaître en cours de traitement, essentiellement lorsque la réplication virale est mal contrôlée. Ceci s'observe lorsque le patient est peu compliant ou lorsque les médicaments n'ont qu'une efficacité partielle.

La résistance aux médicaments antirétroviraux est évaluée au laboratoire par des tests génotypiques : le séquençage de portions du génome viral amplifiées à partir d'un échantillon de plasma permet d'évaluer quels médicaments sont efficaces pour chaque patient individuellement.

On observe également la transmission de souches résistantes : on note la présence d'au moins une mutation impliquée dans la résistance chez environ 10% des nouveaux diagnostics en Belgique.

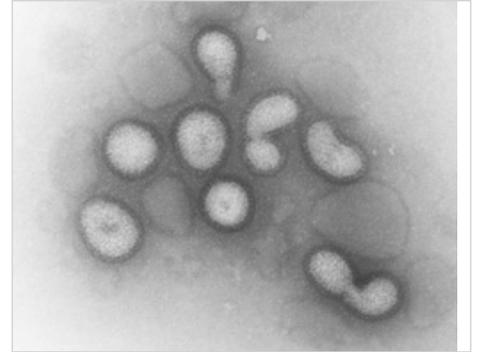
► Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]
Séquençage et principe de la phylogénie (en élaboration)

V. Exemples choisis

2. Virus de la grippe

Virus

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, qui comporte en tout 5 genres. Seuls les virus Influenza infectent l'homme.



V.2.1. Orthomyxovirus

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, qui comporte en tout 5 familles. Seuls les virus Influenza infectent l'homme.

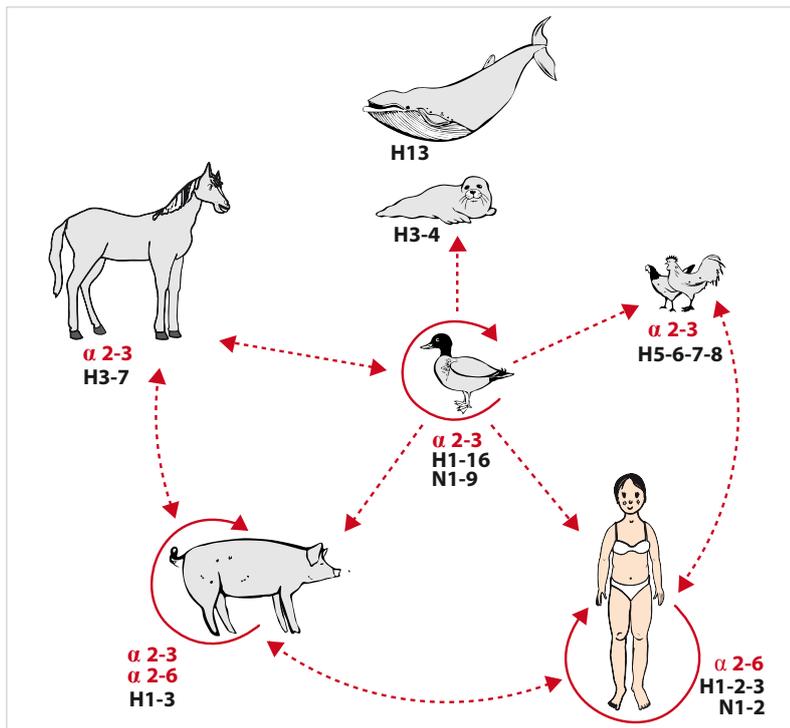
Famille	Genres	Hôtes
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Virus Influenza A</i>	Oiseaux aquatiques (nombreuses espèces animales dont l'homme)
	<i>Virus Influenza B</i>	Homme
	<i>Virus Influenza C</i>	Homme (cochon)
	<i>Thogotovirus</i>	Tiques (moustiques, probablement bétail)
	<i>Isavirus</i>	Saumon

V.2.2. Tableau

Ce sont des virus enveloppés à ARN monocaténaire de polarité négative et segmenté. Il en existe trois types infectant l'homme: influenza A, B et C. Influenza C est beaucoup moins important du point de vue de la pathologie humaine, tant par son importance que par sa fréquence.

Influenza A est prépondérant en médecine humaine. Il provoque les épidémies les plus importantes ainsi que certaines pandémies.

V.2.3. Virus de la grippe



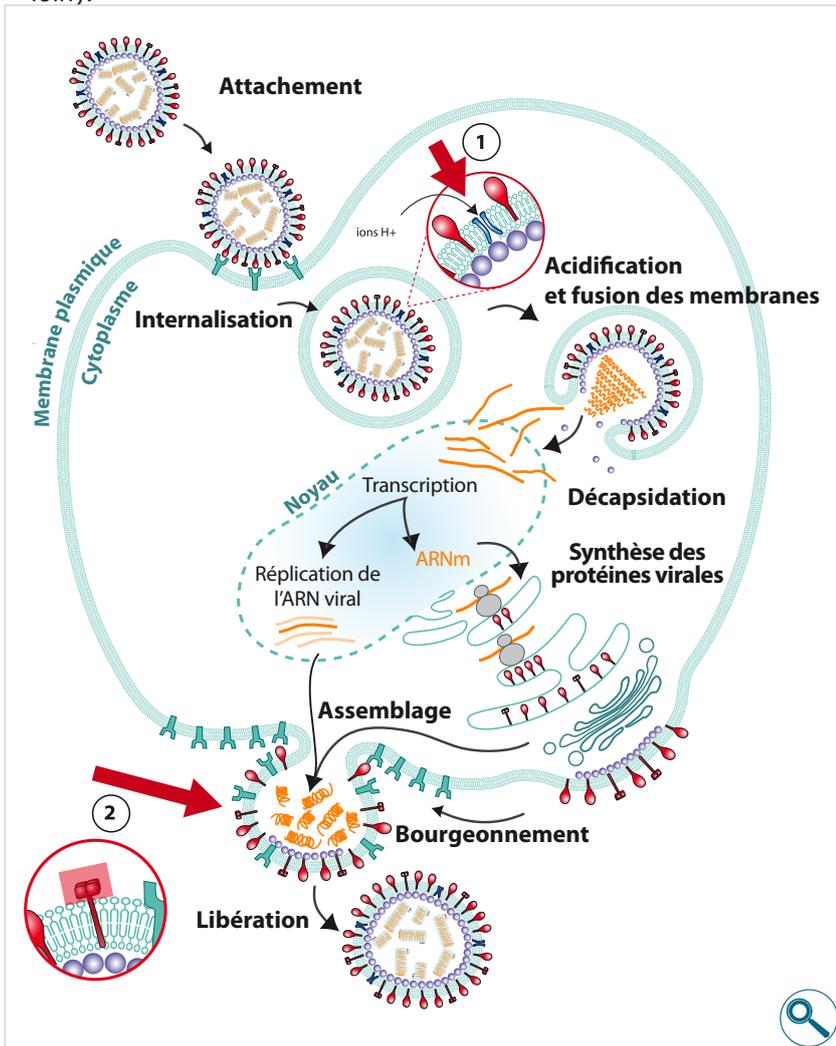
V.2.4. Virus chez les animaux

Les virus influenza A sont à l'origine des virus d'oiseaux aquatiques (canards, mouettes, etc...)

A partir de ce foyer de nombreuses espèces ont été contaminées, dont l'homme, et actuellement il y a une circulation du virus dans la population humaine et porcine.

La structure du virus

La structure du virus *Influenza A* est donnée ici. Le génome viral est composé de **8 segments** (Fig. V.2.5) d'ARN de polarité négative (*Influenza B* en a également 8 mais *Influenza C* n'a que 7 segments). Chaque segment d'ARN est associé à des protéines et forme donc un complexe ribonucléoprotéique. Le génome viral est donc formé d'un ensemble de 8 ribonucléoprotéines (RNP) différentes. Ces ribonucléoprotéines sont en contact avec la protéine M1 (matrice), qui forme une couche protéinique à l'interface des RNP et de l'enveloppe. L'enveloppe porte deux types différents de glycoprotéines : l'hémagglutinine (H ou HA), qui est responsable de l'attachement du virus au récepteur, et la neuraminidase (N ou NA), qui a une fonction enzymatique de sialidase (clive les acides sialiques). Les virus *Influenza A* des oiseaux aquatiques possèdent la plus grande variété d'hémagglutinines (H1 à 16) et de neuraminidases (N1 à 9). L'enveloppe comporte une troisième protéine virale non-glycosylée, appelée M2. Celle-ci s'associe en tétramères qui forment des canaux membranaires qui permettent le transport d'ions H⁺ à travers l'enveloppe virale. Chez le virus *Influenza B*, cette structure d'enveloppe est quelque peu différente, avec la protéine BM2 qui remplace la protéine M2, et une protéine d'enveloppe supplémentaire, NB. Les canaux ioniques de ce virus sont donc partiellement différents et ne sont pas bloqués par les médicaments bloquant les canaux de *Influenza A* (voir plus loin).



V.2.6. Cycle viral de la grippe
Après bourgeonnement les particules virales restent liées à la cellule et entre elles par la liaison avec l'acide sialique. La neuraminidase, présente à la surface de l'enveloppe virale permettra de cliver la liaison entre l'acide sialique et le galactose, libérant ainsi le virus. (voir le détail de l'image « libération »)

Pour obtenir les schémas détaillés des différentes étapes:
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Cycle viral

Le virus s'attache à une cellule par son hémagglutinine. L'hémagglutinine est assemblée sous forme de trimère. Chaque monomère est constitué de deux parties, HA1 et HA2, maintenues entre elles par un pont disulfure. HA1 est une partie globulaire responsable de l'attachement au récepteur. C'est aussi la partie qui porte les principaux déterminants antigéniques. HA2 est une partie allongée, qui assure l'ancrage de l'hémagglutinine dans l'enveloppe virale, grâce à un segment transmembranaire. L'hémagglutinine reconnaît l'acide sialique, lié en position $\alpha 2-3$ ou $\alpha 2-6$.

Pour voir la figure de l'attachement (Fig. V.2.7) [<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Après attachement du virus au récepteur, le virus est internalisé dans un endosome. Cette internalisation permet la fusion des membranes, suivie de la libération des RNP dans le cytoplasme cellulaire.

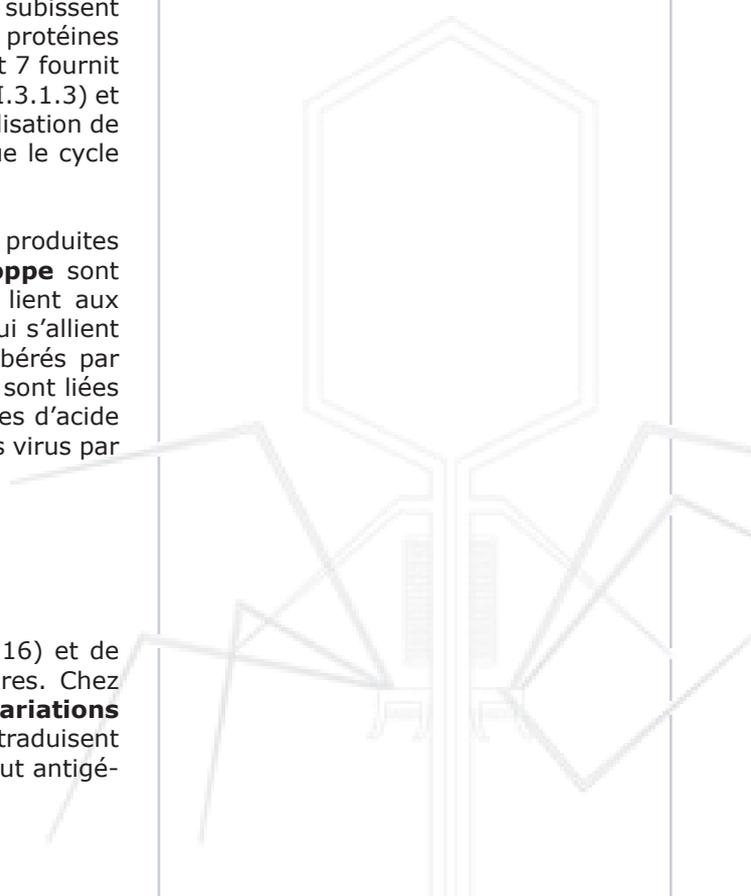
Pour voir la figure de la fusion des membranes et la figure de la décapsidation (Fig. V.2.8) [<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Les ARN viraux sont ensuite transportés vers le noyau cellulaire où le cycle de réplication se déroule (À cet égard, le virus de la grippe constitue une exception notable, la majorité des virus à ARN ayant un cycle de réplication cytoplasmique). Dans le noyau, chaque segment de l'ARN viral (négatif) est, d'une part, transcrit en ARN messager (polarité positive) et, d'autre part, répliqué pour former de nouveaux segments génomiques viraux (ARN- > ARN+ > ARN-). Les ARNm produits à partir des segments 7 et 8 subissent un épissage différentiel ce qui permet la synthèse de 2 protéines différentes à partir d'un même segment (Ex. le segment 7 fournit deux protéines: la protéine M1 qui forme la matrice (ref I.3.1.3) et la protéine M2 qui forme les canaux ioniques). C'est l'utilisation de l'épissage différentiel qui explique sans doute le fait que le cycle viral soit nucléaire.

Dans le cytoplasme les différentes protéines virales sont produites et ensuite assemblées. Les **glycoprotéines d'enveloppe** sont transportées vers la membrane. Les protéines NP se lient aux brins d'ARN de polarité négative pour former les RNP qui s'allient à la protéine M1 formant la matrice. Les virus sont libérés par bourgeonnement. À ce moment-là les particules virales sont liées entre elles et à la membrane cellulaire par des molécules d'acide sialique. La neuraminidase va permettre la libération des virus par hydrolyse de la liaison acide sialique – galactose.

Variabilité virale

Il existe de nombreux types d'hémagglutinines (H1 à H16) et de neuraminidases (N 1 à N9) chez les influenza A aviaires. Chez l'homme on connaît 3 H et 2 N. Il existe deux types de **variations génétiques (et donc antigéniques)** du virus qui se traduisent respectivement par la "dérive antigénique" et par le "saut antigénique".



La dérive antigénique

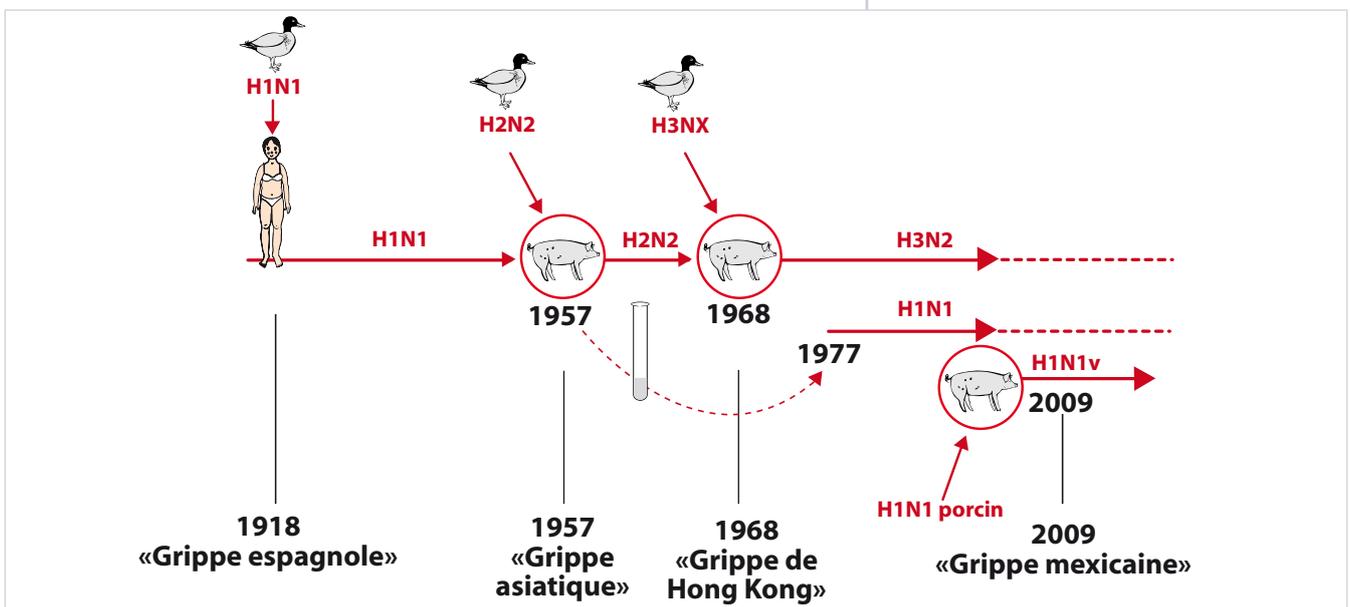
(ou "drift" en anglais) est liée à une variation lente et progressive du génome viral, survenant par mutations ponctuelles apparaissant au cours des cycles de réplication du génome. Du point de vue antigénique, les mutations importantes affectent surtout l'hémagglutinine, mais également la neuraminidase.

Le saut antigénique

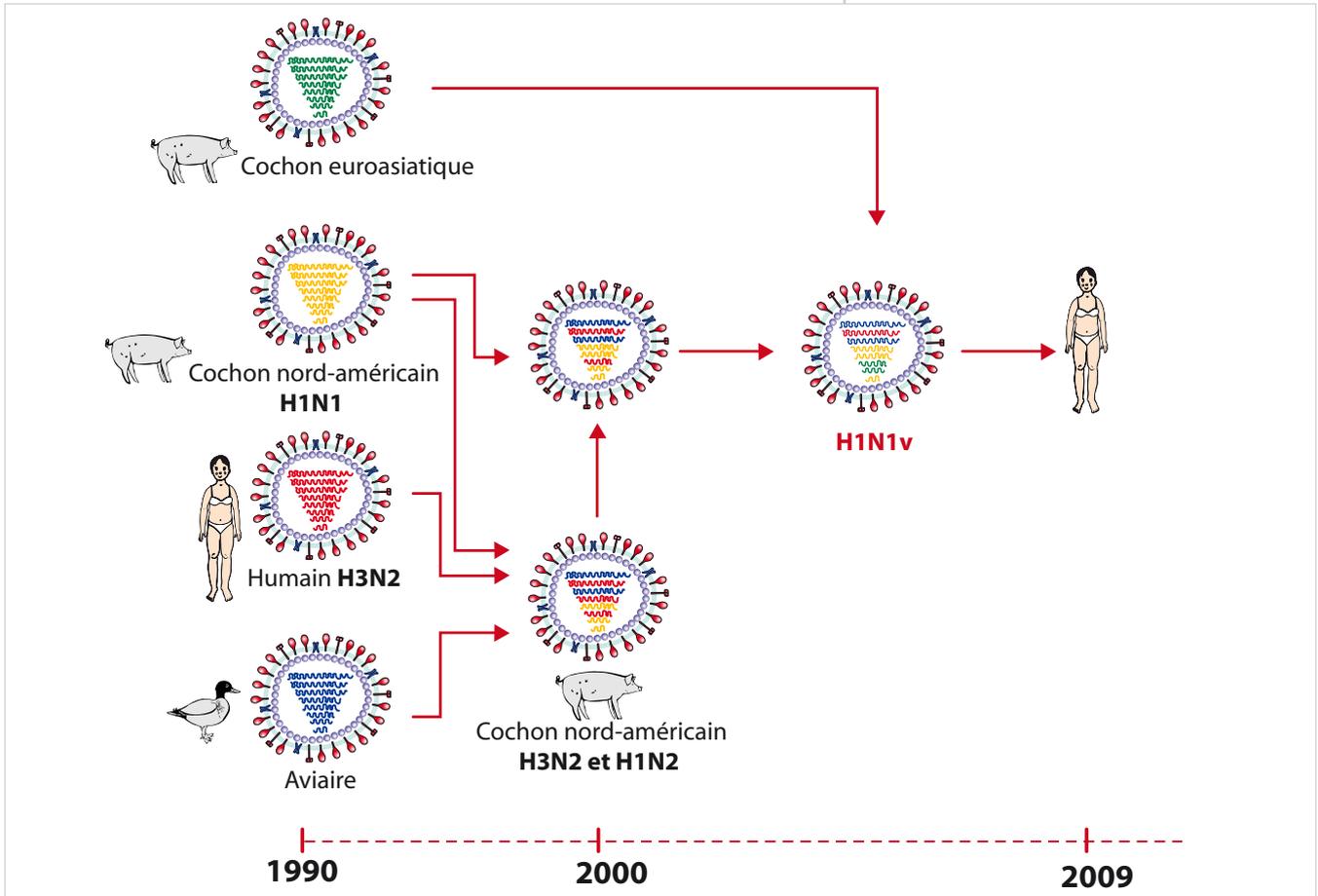
("shift" en anglais) qui apparaît dans le cas d'influenza A, est due à des modifications majeures et soudaines du génome viral. Les souches présentant un saut antigénique peuvent apparaître par transmission directe à l'homme de souches d'origine animale. Elles sont plus souvent dues à un réassortiment génétique survenu entre souches humaines et animales.

Epidémiologie

La grippe évolue sous forme de pandémies ou d'épidémies saisonnières : les pandémies, uniquement dues au virus *Influenza A*, surviennent à intervalles irréguliers d'au moins 10 ans et affectent une grande proportion de la population. Les pandémies surviennent à la suite de l'introduction d'un nouveau virus ou d'un virus ayant subi un saut antigénique. Les épidémies interpandémiques ou saisonnières, d'intensité variable, surviennent annuellement pour la grippe A, et à intervalles plus espacés pour la grippe B. Lors d'une épidémie, le virus peut affecter 5 à 15 % de la population. Les vagues d'infections grippales surviennent presque toujours en automne ou en hiver. La grippe B se répand habituellement de manière plus locale. Les enfants, qui font peu de complications, jouent un rôle important dans la dissémination du virus car ils excrètent le virus plus massivement que les adultes. L'apparition des épidémies de grippe est liée à l'émergence de virus antigéniquement différents des précédents (qui ont subi une dérive antigénique) et au pourcentage de sujets réceptifs (sans anticorps) dans la population. Début 2009 les types d'influenza A circulant dans la population humaine étaient le H3N2 et le H1N1 ainsi que des virus réassortis H1N2.



V.2.9. Ligne du temps du virus de la grippe



Cette situation a changé suite à la nouvelle pandémie, qui a commencé au début de l'année 2009 au Mexique. Le nouveau virus est un virus H1N1, assez différent du H1N1 précédent, circulant probablement depuis quelques années chez le porc. Ce virus appelé A/H1N1v, est issu du réassortiment de segments d'origine porcine américaine, humaine et aviaire. Lors d'un dernier réassortiment deux segments originaire de cochons euro-asiatiques ont été acquis.

Occasionnellement, les humains peuvent être directement infectés par des virus d'origine aviaire. Ainsi, en 2003, lors de l'épidémie d'influenza H7N7 aviaire qui a sévi dans les élevages de poulets en partant des Pays-Bas, des cas de conjonctivite ont été observés ainsi que le décès d'un vétérinaire par pneumonie. De même depuis 2003, une épizootie (=épidémie animale) incontrôlée par H5N1, chez la volaille et chez certains oiseaux migrateurs, entraîne des cas sporadiques humains d'une maladie s'accompagnant de détresse respiratoire avec une forte mortalité (50%).

http://www.who.int/topics/avian_influenza/fr/index.html

V.2.10. Hypothèse sur la genèse du virus pandémique 2009
 Source : Trifonov et al. N Eng J Med 2009, 361:115-119

La surveillance épidémiologique de la grippe (en Belgique par l'**Institut scientifique de Santé publique**) fait appel à un réseau important comprenant des médecins praticiens, des laboratoires de virologie et des centres de référence nationaux et internationaux. La surveillance de la grippe européenne est gérée par le **European Influenza Surveillance Network (EISN)**. Au niveau mondial les données sont centralisées par l'**Organisation mondiale de la Santé**.

Transmission

Le virus de la grippe **se transmet par voie aérogène**, par gouttelettes respiratoires ou par aérosols, générés lors de la toux et des éternuements. Cependant, il peut également se transmettre par contagion à partir de l'environnement, particulièrement via la contamination des mains.

Un patient est infectieux dès le jour qui précède la survenue de symptômes clairs et le reste généralement pendant 5 à 7 jours. Il est à remarquer que la sécrétion de virus peut être plus longue chez les patients immunodéprimés et chez les petits enfants.

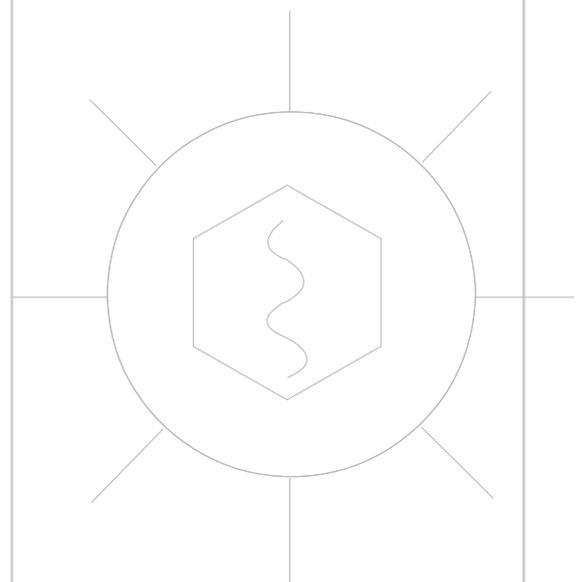
Infection humaine

Le virus pénètre par voie aérienne et l'inflammation atteint habituellement le tractus respiratoire supérieur: rhino-pharynx, trachée et bronches, avec nécrose des cellules ciliées et des cellules à mucus. L'incubation est de 2 à 7 jours, le début de l'accès grippal est brutal et caractérisé par de fortes fièvres, des myalgies, un malaise général et des signes d'irritation conjonctivale, laryngo-trachéale ou bronchique, et parfois par de la diarrhée. La fièvre dure quelques jours et peut avoir une allure diphasique. Les complications peuvent être liées au virus (oedème aigu du poumon, pneumonies, atteintes neurologiques...), à une surinfection bactérienne (pneumonie,...) ou à l'aggravation d'une maladie sous-jacente (cardiaque, pulmonaire, etc...). La grippe est responsable d'une augmentation de l'hospitalisation et de la mortalité chez les sujets âgés, ou des sujets présentant des insuffisances chroniques cardiaques, rénales ou pulmonaires, ou certaines maladies métaboliques comme le diabète.

Diagnostic au laboratoire

Le diagnostic rapide est fondé sur la présence d'antigène viral dans le prélèvement respiratoire, décelé par une technique d'immunofluorescence ou par une technique immunoenzymatique. L'isolement du virus, méthode la plus sensible, est réalisé sur œufs de poule embryonnés ou sur des cultures de cellules de rein de singe, en présence de trypsine (celle-ci permet d'aider le clivage de l'hémagglutinine en HA1 et HA2). Les virus influenza produisent peu d'effet cytopathique, et la présence du virus est démontrée par l'apparition d'une activité hémagglutinante. La recherche d'antigènes viraux sur culture cellulaire, à l'aide d'anticorps monoclonaux, a permis d'accélérer la détection virale. Par ailleurs, la RT-PCR est utilisée de plus en plus largement, car cette technique possède une haute sensibilité de la détection et permet un typage du virus. La recherche d'anticorps n'a qu'une valeur limitée, mais peut être utile dans les complications tardives de la maladie où le virus est souvent plus difficile à détecter. Les méthodes de diagnostic rapide par détection d'antigènes ne suppriment pas l'utilité de l'isolement des virus, nécessaire pour leur caractérisation ultérieure. La caractérisation des virus est particulièrement importante pour définir la composition future du vaccin.

Au cours d'une épidémie, il n'est pas utile de diagnostiquer tous les cas, mais il faut pouvoir agir rapidement sur base d'une présomption.



Prévention

De nombreux types de vaccins inactivés sont utilisés mais la protection, qui est bonne chez les personnes en bonne santé, n'est que d'environ 50 % chez les personnes âgées. Le vaccin est adapté chaque année pour correspondre aux virus circulants et doit être administré annuellement en automne aux personnes à risque ainsi qu'à ceux qui sont en contact familial ou professionnel avec celles-ci. <https://portal.health.fgov.be/pls/portal/docs/...>

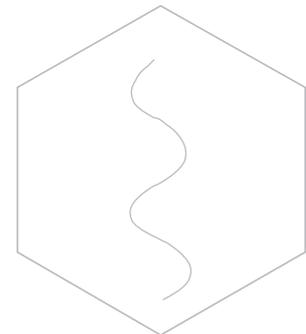
La diminution de la circulation du virus dans l'environnement des personnes à risque, par la vaccination des soignants qui réagissent beaucoup plus efficacement au vaccin, est probablement la mesure de prévention la plus efficace. Il est important d'en être conscient quand on travaille dans le secteur médical. Les vaccins saisonniers actuels contiennent des hémagglutinines et des neuraminidases purifiées à partir de deux souches d'influenza A (H3N2 et H1N1) et d'une souche d'influenza B.

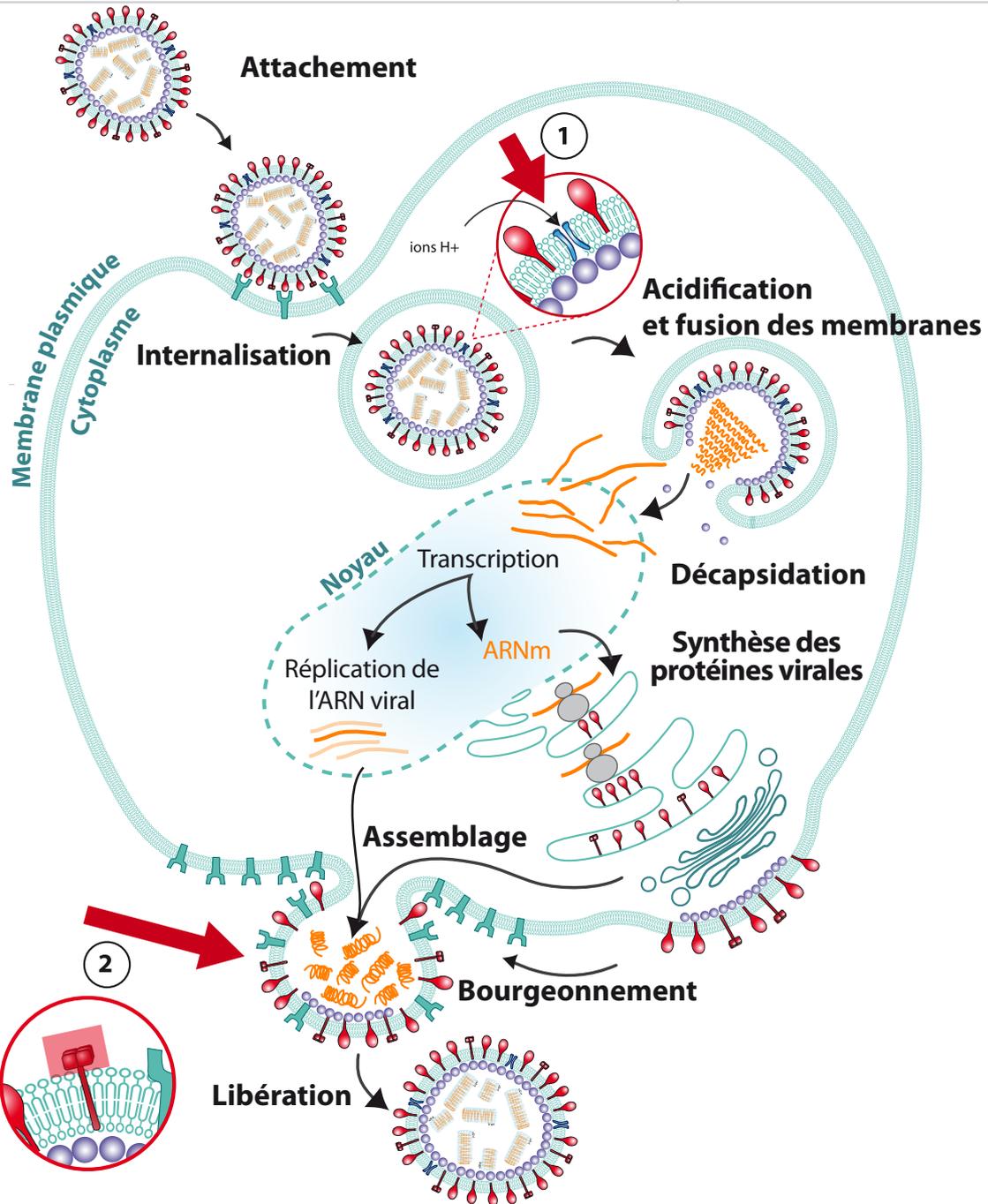
La transmission du virus de la grippe est favorisée par la proximité des gens : éviter les rassemblements est donc utile au plus fort d'une épidémie. Le port d'un masque peut se justifier lors de manœuvres à risque, tel la prise d'échantillons ou l'intubation. Il est important de recommander aux patients de se moucher et de se protéger la bouche et le nez lors d'éternuements avec des mouchoirs en papier qui sont ensuite jetés. Le lavage des mains est primordial, ainsi que la désinfection des surfaces dans une chambre de malade.

Traitement

Pour les virus influenza A, on dispose d'un composé pharmacologique (Rimantadine) à effet préventif. C'est un médicament utilisé dans la maladie de Parkinson et qui bloque les canaux ioniques (protéine M2) d'*Influenza A*. La résistance (tableau V.2.12) à ce produit a fortement augmenté avec comme conséquence une diminution de l'efficacité. Il n'est plus recommandé.

Actuellement des inhibiteurs de la neuraminidase sont disponibles: zanamivir (Relenza®)(par inhalation) et oseltamivir (Tamiflu®) (oral). Comme leur nom l'indique ils bloquent la neuraminidase et empêchent ainsi la libération des particules virales. Ils sont actifs tant contre l'influenza A que contre l'influenza B. Ils peuvent être utilisés de façon prophylactique ou comme traitement. Ils diminuent la durée et la gravité de la maladie s'ils sont administrés dans les 48 heures suivant le début des symptômes. L'apparition, au cours de la saison 2007-2008, de virus influenza A (H1N1) saisonniers résistants à l'Oseltamivir et capables de se transmettre, incite à une utilisation prudente et limitée de ces produits. Le nouveau virus A/H1N1v est actuellement (2011) sensible aux deux inhibiteurs de la neuraminidase.





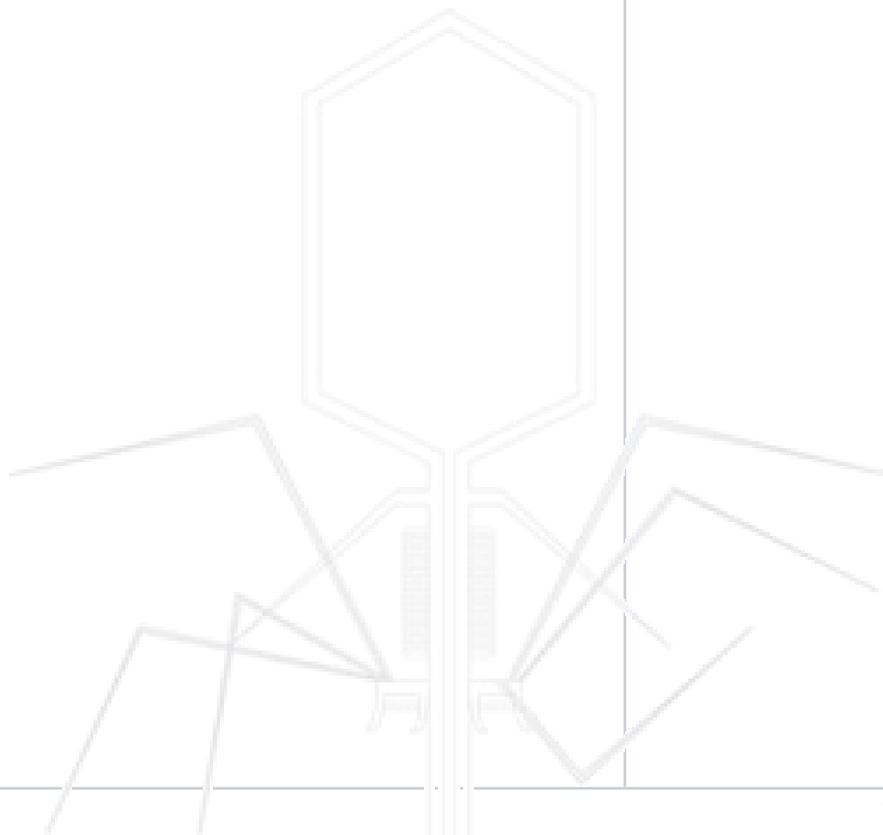
Sites d'activité des différents antirétroviraux:

- 1 **Amantadine** : Désactive les protéines M2, en prévention à la décapsulation du virus
- 2 **Inhibiteurs de la NA**

V.2.11. Sites d'activité des différents anti-rétroviraux.

Période	N d'isolats	% résistant
1992-1995	991	0.8
1996-1997	508	0.4
1998-1999	510	2.2
2000-2001	283	1.4
2002	290	1.4
2003	174	1.7
2004	466	1.9
Oct.'04-Ma.'05	636	14.5
Oct. -Dec. '05	209	92.3

V.2.12. Tableau : Incidence de la résistance de *Influenza A/H3N2* à l'amantadine aux Etats-Unis de 1992 à 2005. Hayden, *N Eng J Med* 2006, 354, 785-788



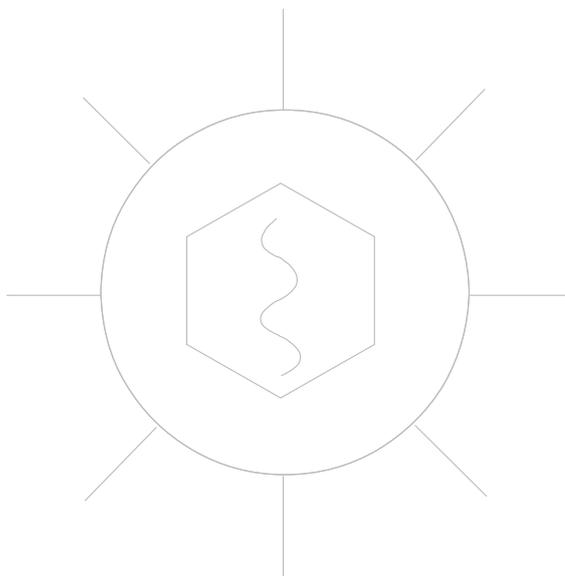
3. Virus TMV

Les virus s'attaquent aussi aux plantes !

Le virus de la mosaïque du tabac a été le premier virus identifié. Dès 1883, Adolf Mayer décrit une maladie du tabac qui provoque des mosaïques, marbures et décoloration de feuilles chez cette plante de la famille des Solanacées. Plus tard, un chercheur russe, Dimitri Ivanovsky, montre que l'agent infectieux qui provoque cette maladie est capable de traverser des filtres poreux en porcelaine, appelés bougies de Chamberland : ces filtres ne permettent pas le passage des bactéries. Finalement, Martin Beijerinck met en évidence la caractère contagieux du fluide filtré, en spécifiant que celui-ci n'est nullement contaminé par des bactéries. M. Beijerinck utilise le terme « virus » qui signifie poison en latin... C'est le début de l'histoire de la virologie. Le virus de la mosaïque du tabac sera à la source de bien des découvertes sur le plan scientifique, comme la première cristallisation d'une protéine virale qui vaudra à W. Stanley un prix Nobel, la découverte que le virus est constitué d'une nucléoprotéine par F. Bawden, la première image en microscopie électronique d'un virus (Kausche et al., 1939), l'hypothèse, vérifiée depuis lors, posée par Rosalind Franklin qu'une seule molécule d'ARN simple brin était associée avec le virus et le modèle qu'elle prépara pour l'exposition universelle de Bruxelles en 1958, la compréhension de l'assemblage de la capsid virale, la résistance au virus de tabac modifié génétiquement par l'introduction d'une séquence du génome viral ou encore la compréhension de la manière dont le virus se déplace de cellules à cellules !

La maladie de la mosaïque du tabac

Le virus de la mosaïque du tabac provoque une mosaïque sur cette plante, et affecte plusieurs solanacées comme la tomate ou le poivron. Le virus a déjà été détecté dans neuf familles différentes et sur plus de 125 espèces de plantes différentes, bien que plusieurs souches aient été décrites, avec parfois des propriétés différentes sur le plan de leur relation avec l'hôte. Ubiquiste, le virus est trouvé partout dans le monde où le tabac est cultivé.



V.3.1. Martinus Beijerinck

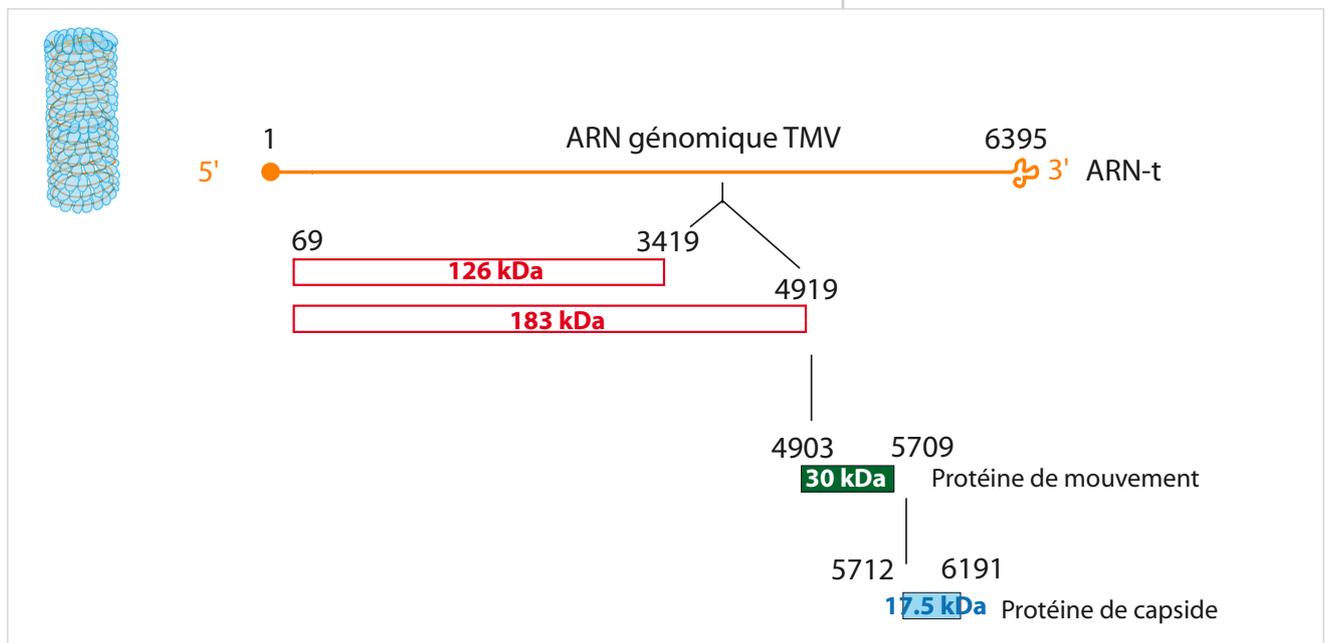


V.3.2. La maladie de la mosaïque du tabac

Description du virus (génom, structure)

Le génome du virus est composé d'un ARN simple brin de **polarité positive**, d'une longueur d'environ 6300 nucléotides. Organisé d'une manière simple, il code pour un nombre limité de protéines : les composants de la réplicase d'origine virale de 126 kDa et, via **translecture**, de 183 kDa est produite directement au départ du génome viral. Après purification, il a été montré qu'ils étaient associés avec un facteur de type **eIF-3** produit par le tabac. Les autres protéines sont produites au départ d'ARN subgénomiques, Ces ARNs codent respectivement pour la protéine de mouvement (30 kDa), la protéine de capsidite et pour une troisième protéine appelée 54 kDa.

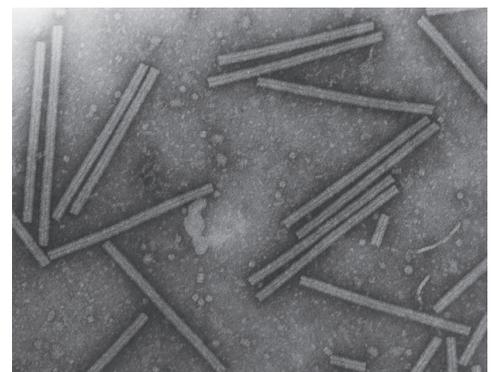
Le génome est flanqué de séquences non codantes, coiffé en 5' et terminé en 3' par une structure en ARN-T, avec 5 **pseudo-nœuds**.



V.3.3. Génome du virus de la mosaïque du tabac.

Le génome viral est constitué d'un brin d'ARN de polarité positive, qui comporte, dans l'ordre : une région 5' non codante (5'NC ou 5'UTR), trois cadres de lecture codant pour le complexe réplicase, suivi de deux cadres de lecture permettant, via des ARN subgénomiques, la production de la protéine de mouvement et de la protéine de capsidite. Le génome viral se termine par une extrémité 3'NC, avec une structure en forme d'ARN-T qui comporte cinq pseudo-nœuds.

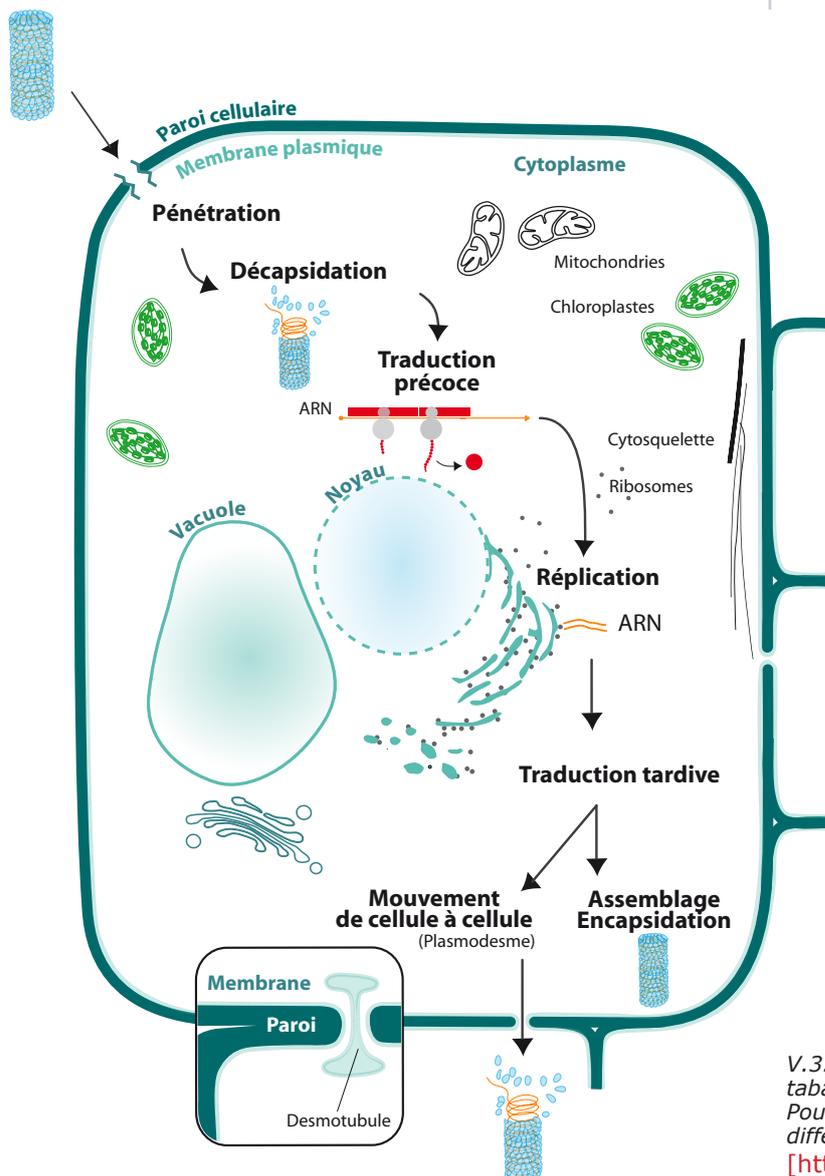
Le virion, en microscopie électronique à transmission, apparaît comme un bâtonnet de 300 nm de long. Il est en fait constitué de 2300 protéines de capsidite, enroulées autour de l'ARN en une structure hélicoïdale qui comporte 16 1/3 molécules par tour, d'un diamètre de 18 nm. Sur les micrographies électroniques, un canal central, vide, est clairement visible. Trois nucléotides du génome sont associés avec une protéine de capsidite. Cette structure assure une protection remarquable du virus et explique sa stabilité exceptionnelle. Le virus possède un point d'inactivation thermique (TIP-thermal inactivation point) de 90°C, ce qui signifie qu'il est capable de survivre à un chauffage de 90°C pendant 10 minutes. L'assemblage du virion débute par une association précise de l'ARN viral (au niveau d'une origine d'assemblage ou "origin of assembly" - OAS), avec des groupes de protéines de capsidites s'autoassociant aux conditions de pH et de force ionique cellulaires.



V.3.4. Virus de la mosaïque du tabac

Le cycle du virus dans la plante

Le virus est transmis mécaniquement. Dès l'entrée dans la cellule, des ribosomes d'origine cytoplasmique s'associent avec l'extrémité 5' de l'ARN viral et facilitent ainsi le processus de désencapsidation (Wilson et al., 1984). Le **complexe réplicase** entre en action pour permettre la synthèse des ARNs subgénomiques. Ceux-ci vont permettre la synthèse assez rapidement de la protéine de mouvement, qui permet au virus de bouger de cellules à cellules sous la forme d'un **complexe nucléo-protéinique**. La protéine 30 kDa exerce un effet sur la taille d'exclusion limite des **plasmodesmes** pour faciliter le passage du virus d'une cellule à l'autre, et est associée avec le cytosquelette cellulaire, pour diriger le virus vers les **plasmodesmes** : cette protéine est produite rapidement durant le cycle viral, mais est dégradée ultérieurement (Padgett et al., 1996). Plus tard, le virus va produire la protéine de capsid en abondance et le virion sera assemblé. La protéine de capsid est impliquée dans le mouvement « longue distance », par opposition au mouvement de cellule à cellule, du virus. On a montré que la réplication virale était efficace dans les **cellules épidermiques**, dans le **mésophylle** ainsi qu'au niveau de **poils racinaires** et de **trichomes**. La localisation du virus est principalement cytoplasmique, mais on a montré une présence dans les **chloroplastes**.



V.3.5. Cycle du virus de la mosaïque du tabac dans la cellule végétale
Pour obtenir les schémas détaillés des différentes étapes:

[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Le mouvement du virus de la mosaïque du tabac dans la plante

Les plantes ont développé des stratégies complexes pour réguler le mouvement intercellulaire et longue-distance des ARN. Les virus des plantes ont ainsi été un outil de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires de ce mouvement de l'ARN, et parmi ceux-ci, le virus de la mosaïque du tabac occupe une place prépondérante.

Mouvement de cellule à cellule

Le virus cible les plasmodesmes cellulaires : la protéine de mouvement du virus, souvent appelée MP ou K30, est capable de moduler la taille d'exclusion limite (ou SEL) des plasmodesmes. Elle a aussi la capacité de s'associer aux ARN monocaténaire simple brin du virus pour former un complexe nucléo-protéinique dont les dimensions sont compatibles avec une translocation au travers des plasmodesmes. La protéine capsidiale du virus n'est pas nécessaire pour assurer ce type de mouvement. Si l'on injecte la protéine de mouvement dans une cellule végétale, celle-ci est capable de bouger rapidement de cellules à cellules. On pense ainsi que les protéines de mouvement d'origine virale reflètent des protéines de plantes impliquées dans le mouvement et la régulation du trafic intercellulaire d'ARN, un domaine passionnant lié à la régulation systémique des gènes. La fusion de la protéine de mouvement du VMT-TMV avec la protéine verte fluorescente (GFP) a permis de localiser celle-ci au sein de la cellule végétale : on a pu montrer ainsi que, outre les plasmodesmes, la protéine de mouvement était localisée en association avec le réticulum endoplasmique et le cytosquelette, les microtubules et filaments d'actine que l'on trouve dans la cellule. Il semble donc que l'ARN viral se déplace, depuis les sites associés à sa réplication au niveau du réticulum endoplasmique jusqu'aux plasmodesmes à l'aide des filaments d'actine.

En se déplaçant de cellules en cellules, le virus est ainsi capable de suivre la voie symplastique et d'éviter la barrière constituée par le cadre de Caspari, pour rejoindre les éléments vasculaires de la plante...

Mouvement longue distance

Le mouvement du virus sur de longues distances est moins bien connu. Le modèle le plus couramment proposé est celui d'un mouvement depuis les cellules du mésophylle vers les cellules-compagnes du phloème, puis au sein du phloème, et certainement un mouvement inverse pour la décharge ultérieure du virus. On sait toutefois que la protéine de capsid est souvent nécessaire à un processus de mouvement à long terme du virus, et c'est bien le cas pour le virus de la mosaïque du tabac. Ryabov et al. (1998) ont même montré qu'il était possible de compléter un VMT-TMV sans capsid à l'aide d'une protéine d'un autre virus, le virus de la rosette de l'arachide ou Groundnut rosette virus !

Comment le virus de la mosaïque du tabac est-il transmis d'une plante à l'autre ?

Le virus est transmis d'une manière très efficace par voie mécanique. On le trouve facilement associé à des vêtements ou des structures de serres, par exemple. Des débris de végétaux peuvent servir la transmission via le sol. Le virus peut être transmis par insectes (type buccal de type broyeur), vraisemblablement par contacts mécaniques. Le virus est souvent associé avec des tissus externes à la graine et peut donc permettre une infection précoce par blessure de l'embryon lors de la germination. Des transmissions par **cuscutes** ont été répertoriées, mais le virus est incapable de se répliquer dans ce type de plantes.

Comment contrôler le virus

Le meilleur moyen pour contrôler le virus est d'adopter une prophylaxie poussée. Eviter toute infestation et travailler avec des plantes saines au départ, limiter les infections potentielles par des mesures de prudence simples, comme par exemple demander aux travailleurs de se laver les mains au savon ou d'éviter de fumer (le tabac manufacturé est une source d'infection). Le virus est aussi inactivé avec de l'hypochlorite de sodium à 1 %. Le trempage des mains des travailleurs dans du lait à 1% a été également utilisé pour limiter l'infection virale, sur un plan expérimental.

L'usage de **cultivar** de tabac résistant au virus a permis de limiter les pertes en rendement à environ 1%. C'est avec le TMV que l'on a démontré pour la première fois le concept de « résistance dérivée du pathogène », en clonant un gène du virus dans une plante de *Nicotiana*. Plusieurs plantes transgéniques expriment une résistance au virus. Il est aussi possible de protéger la plante en l'inoculant « préventivement » à l'aide d'une souche du TMV peu virulente : c'est ce qu'on appelle la prémunition. Cette technique, bien qu'effective, présente plusieurs limitations qui ont empêché son utilisation sur une large échelle, comme par exemple la possibilité de synergisme avec des infections par d'autres espèces virales.

La semence suspectée d'infection peut être traitée à la chaleur ou trempée dans une solution de sodium triphosphate.

Utiliser le virus pour produire des vaccins ou comme vecteur dans des plantes ?

La structure du virus, qui permet d'envisager une longueur variable du génome, la très haute teneur en virion des plantes infectées (on peut extraire jusqu'à 4 grammes de virus par kilo de plantes), l'excellente connaissance du génome viral et de son fonctionnement et sa capacité à infecter plusieurs types de plantes ont amené des scientifiques à proposer d'utiliser le virus pour la production de protéines d'intérêt médical.

5. Papillomavirus

1. Classification et propriétés

Autrefois, les Polyomavirus et les Papillomavirus étaient regroupés en une famille unique nommée *Papovaviridae* (nom qui regroupe le début du nom de chaque membre). Ces deux groupes ont été séparés en deux familles distinctes: les *Polyomaviridae* (ou "Polyomavirus") et les *Papillomaviridae* (ou "papillomavirus").

Ces deux familles de virus ont en commun d'être des **petits virus à ADN double brin non-enveloppés**. Vu leur faible capacité codante, les petits virus à ADN dépendent des enzymes cellulaires pour assurer la réplication de leur génome. Pour exploiter au mieux les enzymes cellulaires, les petits virus à ADN incitent la cellule hôte à être elle-même en voie de division active. Ces virus sont donc susceptibles de causer l'immortalisation ou la **transformation cellulaire**.

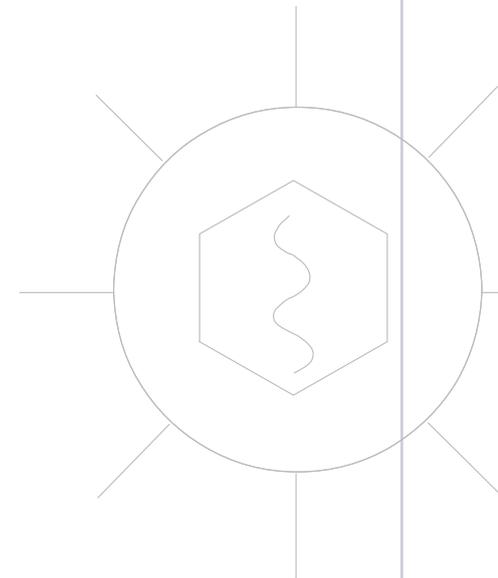
La famille des Polyomaviridae

► Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

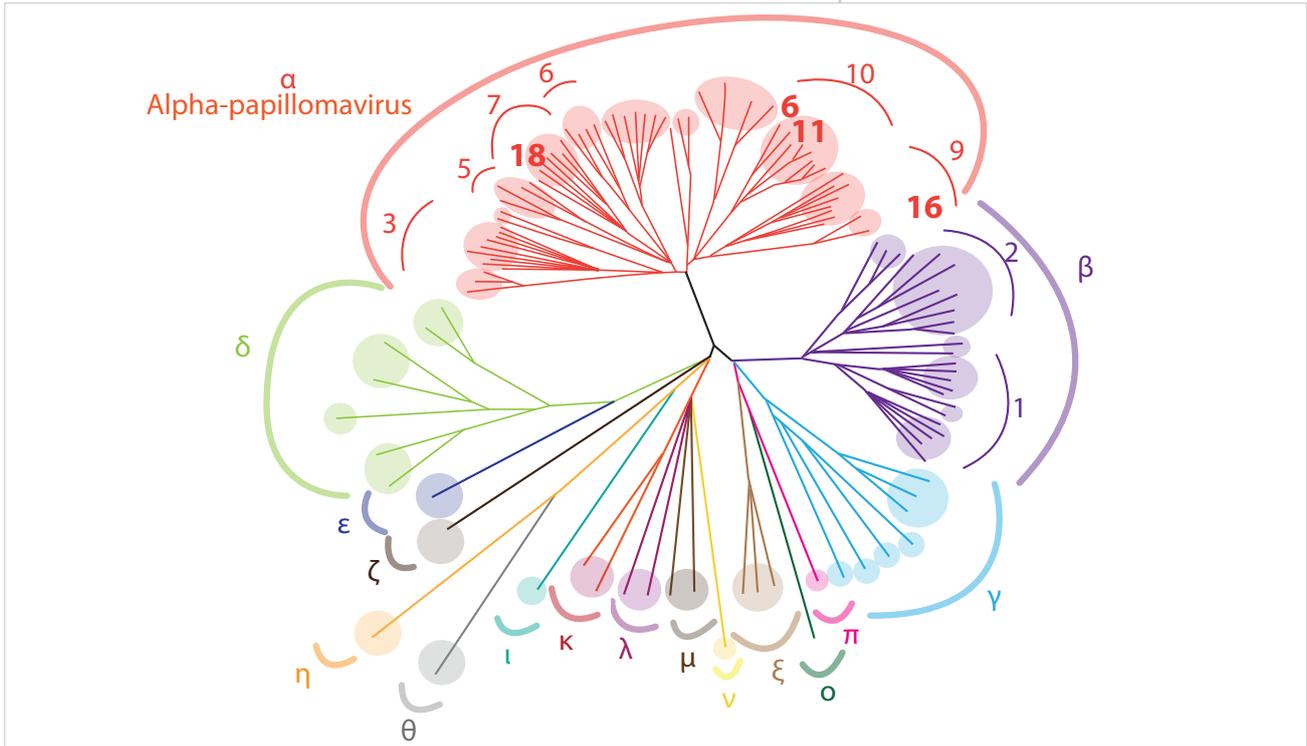
- La famille des *Papillomaviridae* représente un exemple typique de famille virale composée de petits virus à ADN pouvant entraîner la formation de tumeurs. Ils peuvent, chez l'homme ou l'animal, causer des lésions liées à la prolifération cellulaire, qui vont de la verrue au cancer (notamment le fréquent cancer du col de l'utérus).

Actuellement, plus de 100 types de Papillomavirus humains (HPV = human papillomavirus) ont été identifiés. Ils sont classés en genres, espèces et types, en fonction de la séquence de leur génome (**Figure 1. Phylogénie**). Les différents types sont partagés entre des types affectant les muqueuses et d'autres touchant la peau. Ensuite les types peuvent être divisés en types donnant des lésions bénignes (non cancéreuses) et celle pouvant donner lieu à des cancers.

Les virus des types HPV-16 et HPV-18 causent à eux seuls plus de 70% des **cancers du col de l'utérus**, du vagin ou de l'anus. Ils appartiennent au genre "alpha" et, respectivement, aux espèces "9" et "7". La découverte du lien de causalité entre Papillomavirus et **cancer du col de l'utérus** ont valu à H. zur Hausen le **prix Nobel** de Physiologie et médecine 2008.



Famille	<i>Papillomaviridae</i> (! seulement 40% id. entre souches les plus divergentes)
Genre	(< 60% id.) 12 genres: α , β ,...
Espèce	(60 à 70% id.): 5, 6, 7, ...
Type	(71 à 89% id.): HPV-16,-18...
Sous-type	(90 à 98 % id.)
Variant	virus dont le génome ne diffère que très peu d'un autre, mais dont le phénotype peut être légèrement différent.
Isolat	virus nouvellement isolé, même s'il est semblable à un virus isolé précédemment.

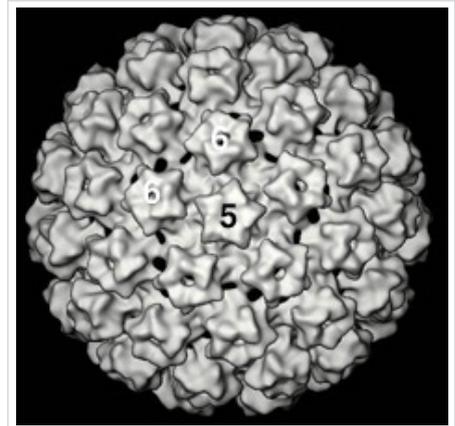


V.5.1. Arbre phylogénétique de la famille des Papillomaviridae. La famille des Papillomaviridae est subdivisée en une douzaine de genres désignés par une lettre grecque (α , β , γ , ...). Chaque genre est divisé en espèces. Celles-ci sont désignées par un chiffre. Enfin, au sein d'une espèce, les virus sont classés en types (HPV-16, HPV-18 etc...). On considère que des virus appartiennent à des types distincts si leurs génomes présentent moins de 90% d'identité au niveau de la séquence nucléotidique. Au sein d'un sous-type, on peut trouver plusieurs variants et plusieurs isolats. Par exemple, le Papillomavirus humain HPV-16, susceptible de causer un cancer du col utérin, appartient au type HPV-16, à l'espèce 9 et au genre α .

2. Structure

a. Capside

Les Papillomavirus sont des virus non-enveloppés, limités par une capsidie de symétrie icosaédrique de 52 à 55 nm de diamètre. Deux protéines interviennent dans la constitution de la capsidie: L1 et L2. Cependant, la protéine L1 forme à elle seule l'essentiel de la capsidie. Dans cette capsidie, 360 protéines L1 sont assemblées en 72 pentamères. 12 pentamères sont situés sur un axe de symétrie 5 tandis que 60 pentamères sont centrés sur un axe de symétrie 6. L'assemblage de la capsidie fait donc intervenir différents types d'interactions entre protéines L1 de pentamères voisins. Par analogie avec la situation de SV40 (Figure V.5.2), on pense que ces différentes interactions sont possibles grâce à la flexibilité de la protéine L1.



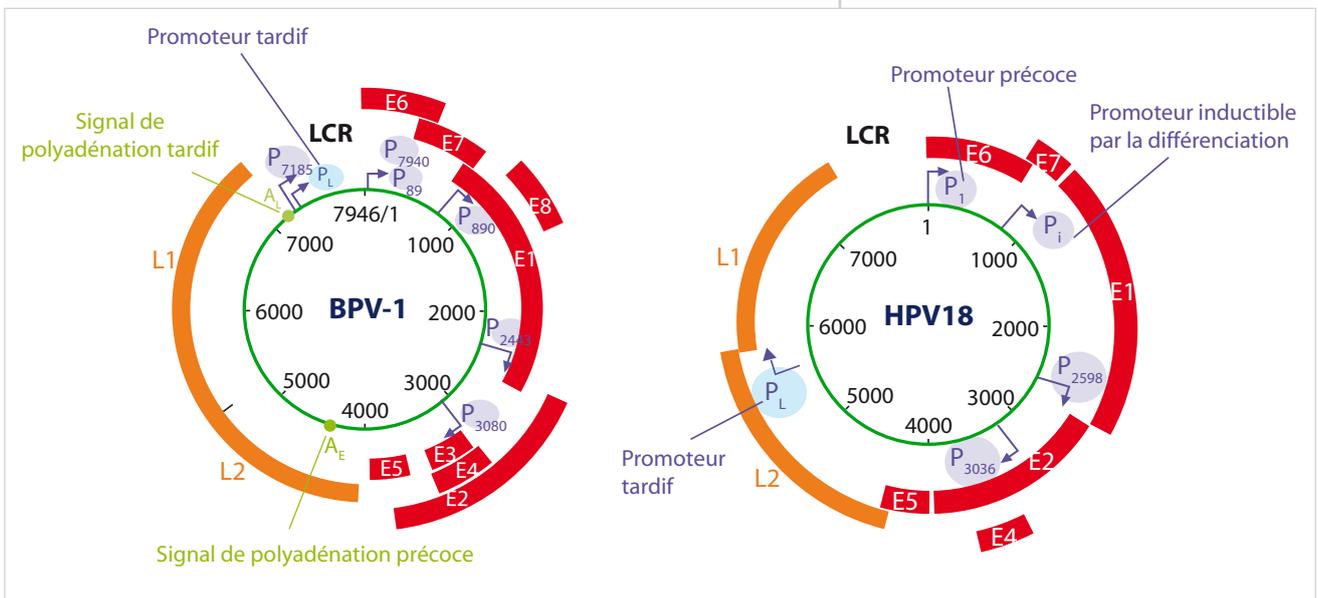
V.5.2. Structure de la capsidie des Papillomavirus.

360 protéines L1 sont assemblées en 72 pentamères. 12 pentamères sont situés sur un axe de symétrie 5 (indiqué par un 5 noir) tandis que 60 pentamères sont centrés sur un axe de symétrie 6 (indiqué par un 6 blanc).

(Figure adaptée de Wikipedia : Trus BL, Roden RB, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FP. (1997) Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. Nature Structural Biology 4(5):413-20).

b. Génome

Le génome des Papillomavirus est une molécule d'ADN double brin circulaire d'environ 8kb qui code pour 8 à 10 protéines. Une curiosité du génome des Papillomavirus est que tous les gènes sont exprimés à partir du même brin d'ADN. Grâce à l'utilisation de promoteurs et de signaux de polyadénylation alternatifs, différents transcrits peuvent être générés. Ceux-ci subissent ensuite un **épissage alternatif** avant leur traduction, de sorte que malgré sa petite taille, le génome viral peut coder jusqu'à une dizaine de protéines. Les promoteurs de transcription sont régulés de façon à ce que les protéines virales soient exprimées en deux phases (précoce et tardive). Les protéines précoces sont appelées E1, E2... (E pour "early"). Les protéines tardives sont nommées L1 et L2 (L pour "late"). (Figure 3-GENOME et expression).



V.5.3. Cartes génétiques des Papillomavirus bovin BPV-1 et humain HPV-18. Le génome des Papillomavirus est une molécule d'ADN double brin d'environ 8kb. L'utilisation de plusieurs promoteurs de transcription (indiqués par P sur le génome) permet une régulation transcriptionnelle en fonction du temps (early & late) et en fonction de l'état de différenciation de la cellule infectée. L'utilisation de signaux de polyadénylation alternatifs et l'épissage alternatif augmentent la complexité de la régulation de l'expression des gènes. Ainsi, plus de 20 types d'ARNm matures auraient été identifiés dans le cas du BPV-1. Une curiosité du génome des Papillomavirus est que les gènes sont transcrits dans le même sens. Les ORFs codant les protéines précoces (E) sont indiquées en rouge. Les ORFs codant pour les protéines tardives (L) sont indiquées en orange.

3. Cycle viral

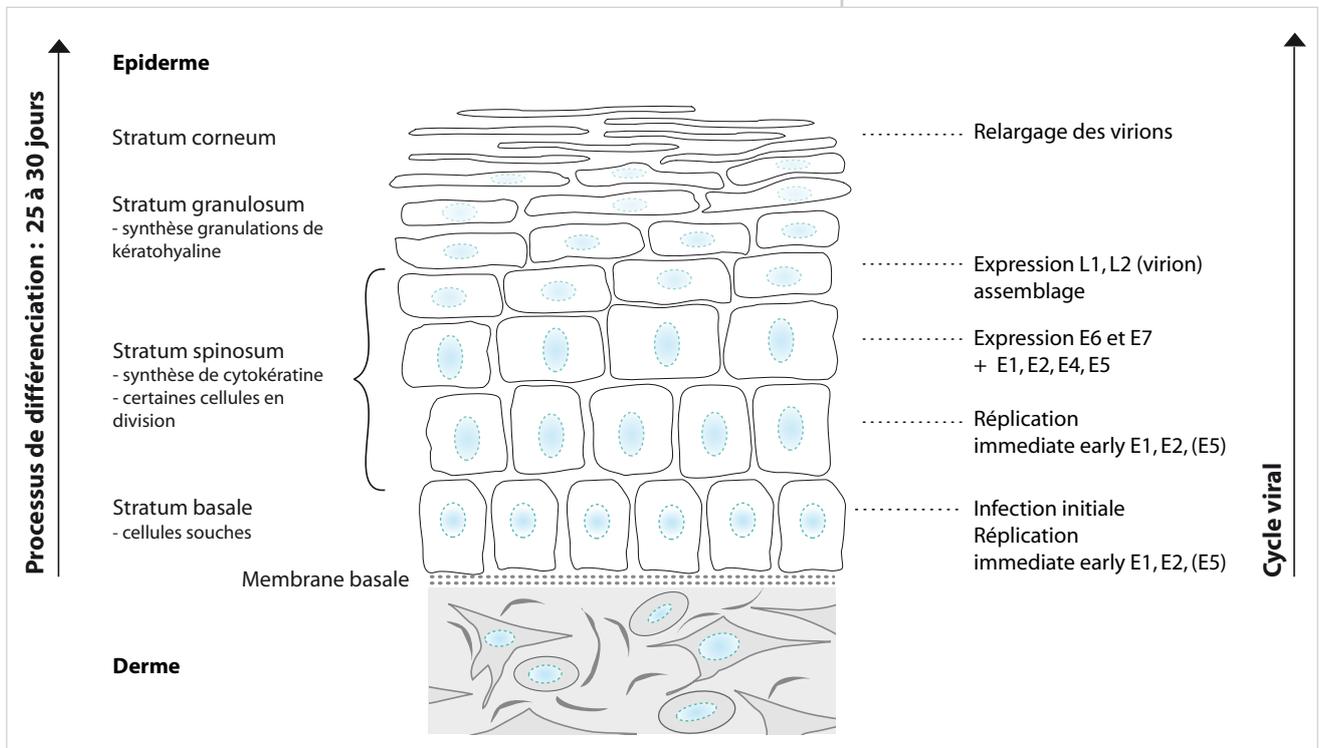
a. Infection des épithéliums

Les Papillomavirus sont remarquables par le fait qu'ils infectent de façon spécifique les cellules des épithéliums stratifiés squameux, qui sont en différenciation constante. La conséquence de cette spécialisation est qu'il n'est pas possible d'étudier le cycle viral dans des cultures cellulaires classiques, in vitro. Le fonctionnement des Papillomavirus est donc nettement moins bien compris que celui des Polyomavirus comme SV40.

Le récepteur des Papillomavirus n'a pas été formellement identifié. Les intégrines cellulaires (en particulier les intégrines α6β1 et α6β4) semblent participer à la reconnaissance des cellules par ces virus. Les glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules pourraient aussi contribuer à l'infection des cellules. L'entrée du

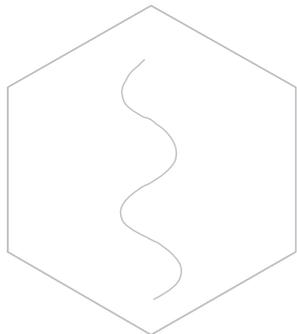
Le virus semble impliquer une étape d'endocytose dans des vésicules à clathrine, préalable à la libération du génome (peut-être accompagné de la protéine L2) dans la cellule. Cependant, l'étape d'entrée pourrait différer entre virus de types distincts.

Dans l'épiderme, les virus infectent les cellules situées à la base de l'épithélium (cellules souches). Une partie de ces cellules se différencie pour fournir des cellules épithéliales kératinisées qui migrent vers la surface de l'épiderme. Les étapes du cycle de réplication du virus sont étroitement couplées à la différenciation cellulaire, de sorte que les protéines de capsid (et donc les particules virales infectieuses) ne sont produites qu'en fin de cycle, par les cellules fortement différenciées, proches de la surface. Les virus sont alors libérés par ces cellules qui desquament en surface de l'épiderme.



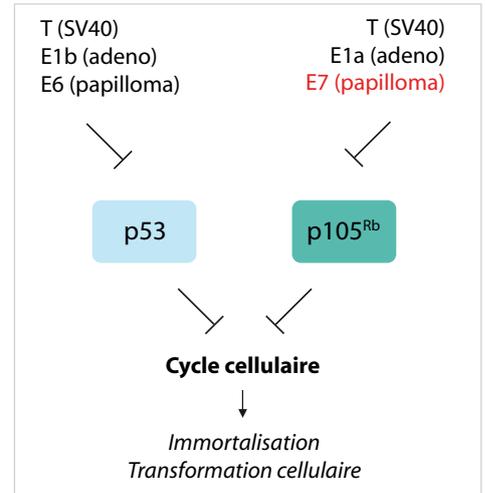
V.5.4. Différenciation de l'épiderme et cycle des Papillomavirus.

La réplication du génome viral et l'expression de certains gènes précoces prennent place dans une couche profonde de l'épiderme, au niveau de cellules souches capables de se multiplier pour fournir en permanence des nouvelles cellules qui migrent en surface de l'épithélium, puis qui sont éliminées (desquamation). L'expression des gènes est régulée par la différenciation progressive de ces cellules, pendant leur migration vers la surface. Les protéines de capsid qui permettent de former de nouveaux virions sont produites par des cellules fortement différenciées, proches de la desquamation. Ce processus permet la réplication du génome dans les cellules mitotiques profondes et le relargage de particules virales infectieuses en surface.



b. Protéines précoces et transformation cellulaire

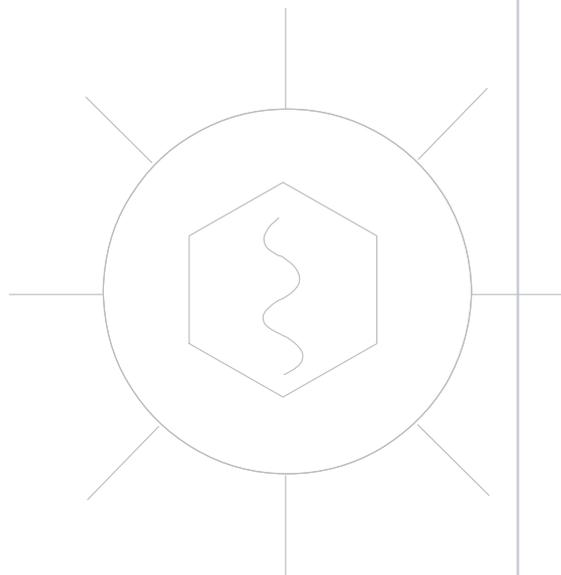
La majorité des protéines (6 à 8) sont exprimées de manière précoce. Elles possèdent des fonctions régulatrices et interagissent avec les facteurs de la cellule hôte. Parmi ces protéines, les protéines E6 et E7 semblent participer de manière prépondérante au pouvoir transformant des virus, en interagissant respectivement avec les protéines cellulaires p53 et p105Rb. Ces dernières sont des protéines "suppresseurs de tumeurs" qui participent au contrôle négatif du cycle cellulaire. L'interaction des protéines virales avec ces deux régulateurs inhibe leur fonction et incite la cellule à proliférer. Cette situation est donc analogue à celle rencontrée pour la protéine T de SV40. (De la même manière, les protéines E1a et E1b des adénovirus - qui sont aussi de petits virus à ADN - interfèrent aussi avec la fonction de p53 et p105Rb).

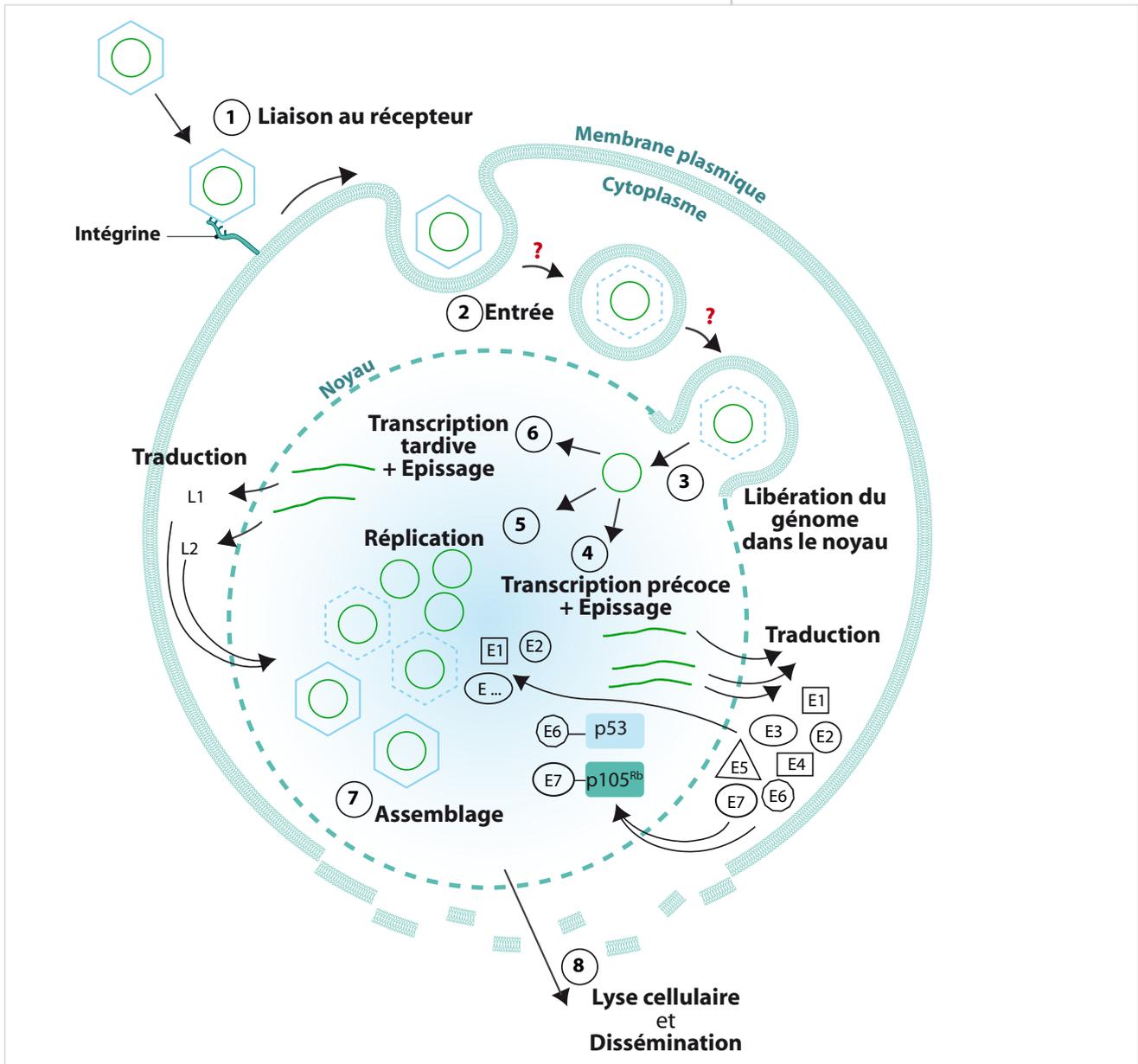


V.5.5. Protéines virales interagissant avec p53 et p105Rb. En inhibant l'activité de ces deux protéines, les virus empêchent le processus d'apoptose et incitent la cellule à passer en phase de division active.

c. Protéines tardives: formation de la capside

Deux protéines, L1 et L2 sont exprimées de manière tardive et correspondent aux protéines de capside. L1 est une protéine de 55 kDa et représente 80% des protéines du virion. L2 est une protéine de 70 kDa moins abondante. Elle participe à la sélectivité de l'encapsidation de l'ADN viral.





V.5.6. Cycle viral du Papillomavirus

VLPs et Vaccins

Lorsque le gène codant la protéine L1 est surexprimé dans un système d'expression eucaryote ou bactérien, les protéines L1 produites peuvent s'assembler spontanément pour former des particules dépourvues de génome, appelées "VLP" ("virus-like particles"). Lorsque la protéine L2 est co-exprimée, elle est également incorporée dans les VLPs, mais elle nettement moins abondante que L1.

Récemment, des vaccins ont été conçus pour prévenir les cancers liés aux infections par les Papillomavirus. Ils sont constitués de VLPs issus des souches les plus couramment rencontrés dans les cancers (HPV16 et 18) et un des deux vaccins actuels contient les antigènes de HPV11 et 6, protégeant contre la majorité des papillomes bénins. Ces papillomes, généralement génitaux et appelés condylomes, constituent l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente. Les vaccins sont destinés prioritairement aux femmes jeunes, n'ayant pas encore eu de contacts sexuels, et donc non infectées par un des virus présents dans le vaccin.

6. Picorna

1. Virus

La famille des *Picornaviridae* ou picornavirus regroupe de nombreux petits virus à ARN (PICO = petit + RNA + VIRUS). Ce sont parmi les plus petits virus animaux décrits. Leur capsid est d'un diamètre d'environ 30 nm et n'est pas entourée par une enveloppe.

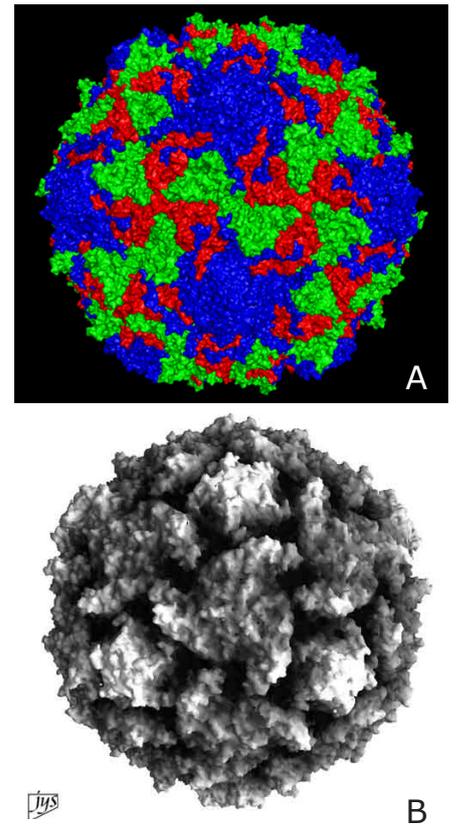
Le picornavirus le mieux connu est le virus de la poliomyélite ou "virus polio" (PV). Il en existe trois sérotypes, appelés Mahoney (type I), Lansing (type II) et Leon (type III).

Le génome du virus polio fut l'un des premiers à être séquencé complètement; c'est aussi le premier virus animal qui a pu être produit *in vitro*, à partir d'acides nucléiques de synthèse et d'un système de répllication acellulaire. (Voir tableau ci-dessous).

Ce virus a donc servi de modèle pour comprendre les mécanismes de l'expression des gènes et de la répllication des virus apparentés.

Il est frappant de constater que les vaccins dirigés contre ce virus ont été développés avant même de connaître la séquence et de comprendre les bases moléculaires du fonctionnement du virus. Une vaste opération menée par l'OMS depuis 1988 a pour but d'éradiquer le virus polio.

Outre le virus polio, la famille des *Picornaviridae* compte de nombreux représentants. Les récents développements du séquençage à haut débit ont permis d'identifier de nouveaux membres de cette famille et suggèrent que de très nombreux virus apparentés restent à découvrir.



V.6.1. Représentation tridimensionnelle de la capsid du virus polio de type 1.

(A) Représentation faisant apparaître les différentes protéines de capsid. VP1 (bleu), VP2 (vert), VP3 (rouge). VP4 n'est pas visible, étant à l'intérieur de la capsid.

(B) Représentation montrant le relief de la capsid (structures externes plus claires et régions profondes plus sombres) et faisant apparaître le canyon.

Illustrations fournies par Jean-Yves Sgro, d'après la structure déterminée par Hogle, Chow and Filman, (1985) *Science* 229: 1358-1365. Données de la banque PDB: 2PLV.

Voir aussi le site web sur la structure des virus: <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php>

identification du virus	1908 (Landsteiner & Popper)
culture du virus sur cellules	1949 (Enders)
vaccin inactivé	1955 (Salk)
vaccin atténué	1962 (Sabin)
séquence complète du génome	1981 (Racaniello, Wimmer)
système de génétique inverse	1981 (Racaniello)
structure 3-D de la capsid	1985 (Hogle)
répllication du virus en système acellulaire	1995 (Barton, Flannegan)
obtention de virus <i>in vitro</i> à partir d'acides nucléiques synthétiques	2002 (Wimmer)

V.6.2. Etapes de la caractérisation du virus polio

2. Classification

Les picornavirus sont la cause de nombreuses pathologies humaines et vétérinaires. Ils sont actuellement (2010) classés en **12 genres** [voir <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>] mais leur classification évolue très rapidement, notamment suite à la découverte récente de nombreux génomes grâce à la métagénomique (séquençage à haut débit d'échantillons biologiques).

Parmi les picornavirus les mieux connus, on peut citer les trois virus polio (agent de la poliomyélite), le virus de l'hépatite A (HAV), les rhinovirus responsables d'affections respiratoires communes, ou encore le virus de la fièvre aphteuse (FMDV - foot and mouth disease virus) qui peut poser d'énormes problèmes en médecine vétérinaire.

- Enterovirus
- Parechovirus
- Aphthovirus
- Cardiovirus
- Hépatovirus

► Pour en savoir + sur les différents virus [<http://www.virologie-uclouvain.be>]

3. Structure du virion

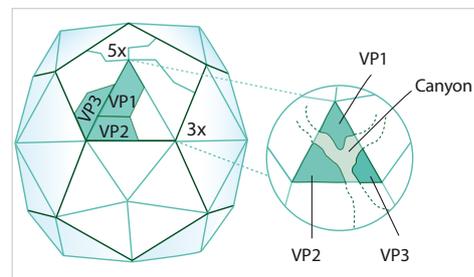
Capside

Les capsides de divers picornavirus ont pu être cristallisées. Leur structure 3D a été déterminée par diffraction des rayons X. La capside possède une symétrie **icosaédrique** comportant des axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2.

[Pour comprendre "icosaédrique" : voir chap I.3.3 et sur wikipedia: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Icosaèdre>]

Elle est composée de 60 copies de 4 protéines: VP1, VP2, VP3 et VP4.

La protéine VP4 est essentiellement localisée à la surface interne de la capside. Les trois autres protéines participent plus directement à la structure de la capside. Celle-ci est composée de 12 pentamères. Chaque pentamère est formé par la répétition (5X) d'un assemblage de VP1, VP2, VP3 et VP4. Les protéines VP1, VP2 et VP3 ont une structure assez similaire. Cependant, leur répartition dans la capside leur confère des situations très différentes. Les protéines VP1 sont regroupées autour des axes de symétrie d'ordre 5. Les protéines VP2 et VP3 alternent autour de l'axe de symétrie d'ordre 3. Pour la plupart des picornavirus, la protéine VP1 contient, d'une part, une partie importante du site de fixation au récepteur cellulaire et, d'autre part, certains sites antigéniques majeurs.



V.6.3. Structure de la capside

La capside des picornavirus possède une symétrie de type icosaédrique (un icosaèdre est un polyèdre régulier à 20 faces, caractérisé par la présence d'axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2). Dans la capside des picornavirus, chacune des 20 faces est subdivisée de sorte à obtenir 60 faces organisées en 12 pentamères. Chacune des 60 faces est formée par 3 protéines: VP1, VP2, et VP3. Une 4ème protéine, VP4, est localisée à la face interne de la capside. Elle est également présente à raison de 60 copies par capside. Les protéines VP1 sont concentrées autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 (indiqué "5x"). Les protéines VP2 et VP3 alternent autour de l'axe de symétrie d'ordre 3 (indiqué "3x").

A droite: localisation du canyon présent dans la capside des Rhinovirus et poliovirus. Le canyon est une dépression formée essentiellement par la protéine VP1 autour de l'axe de symétrie d'ordre 5, au niveau de sa jonction avec les protéines VP2 et VP3.

Le "canyon"

Dans le cas du virus polio et des Rhinovirus, le site de fixation du récepteur se situe dans VP1, au fond d'une structure en creux (canyon) faisant le tour de l'axe de symétrie 5. De par leur épaisseur, les anticorps seraient incapables d'atteindre le fond du canyon. Par contre, les récepteurs du virus polio et des rhinovirus (CD155 et ICAM-1, respectivement), qui sont des molécules plus étroites, pourraient interagir avec le fond du canyon et permettre ainsi l'attachement et l'entrée du virus.

Des molécules antivirales ciblent le canyon du virus polio et des rhinovirus Pour en savoir + [\[http://www.virologie-uclouvain.be\]](http://www.virologie-uclouvain.be)

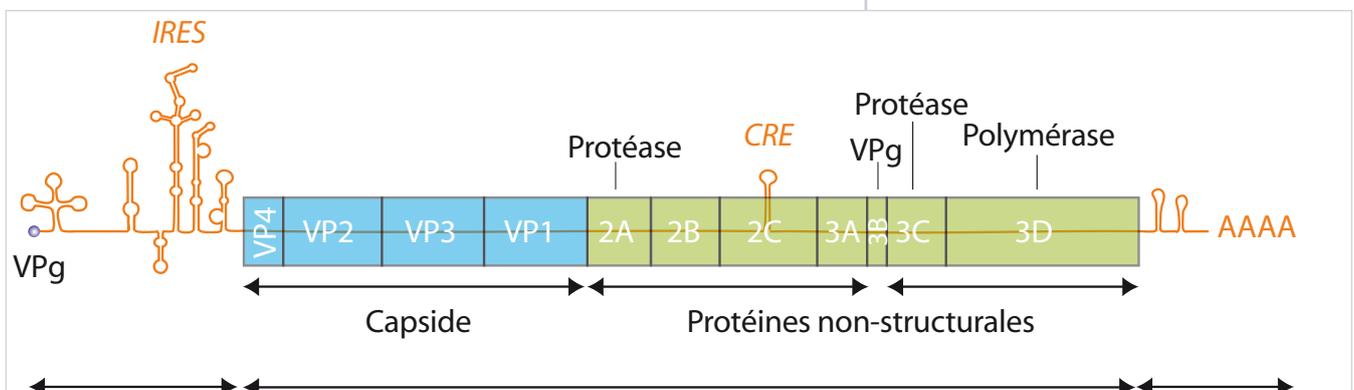
Il faut noter que la capsidie de tous les picornavirus ne possède pas de canyon. La capsidie des Cardiovirus ne possède qu'une faible dépression. Il semble, dans ce cas, que l'interaction avec le récepteur s'opère par des boucles protéiques exposées à la surface de la capsidie.

Génome

Le génome des picornavirus est une molécule d'ARN de polarité positive d'environ 8 kb. L'extrémité 5' de cette molécule ne possède pas de coiffe. A certaines étapes du cycle viral (encapsidation et réplication) ainsi que dans le virion, l'extrémité 5' est associée de façon covalente à la protéine virale 3B (appelée aussi VPg). L'extrémité 3' du génome comporte une queue de polyA qui fait constitutivement partie de ce génome, mais dont la longueur est régulée.

Le génome comporte une région 5' non-codante de 600 à 1000 nucléotides, un long cadre ouvert de lecture d'environ 6000 à 7000 nucléotides et une courte région 3' non-codante.

Le génome viral peut se comporter comme un ARN messager et être traduit directement par les ribosomes cellulaires grâce à la présence d'un IRES (internal ribosome entry site) dans la région 5' non-codante.



V.6.4. Génome du virus polio.

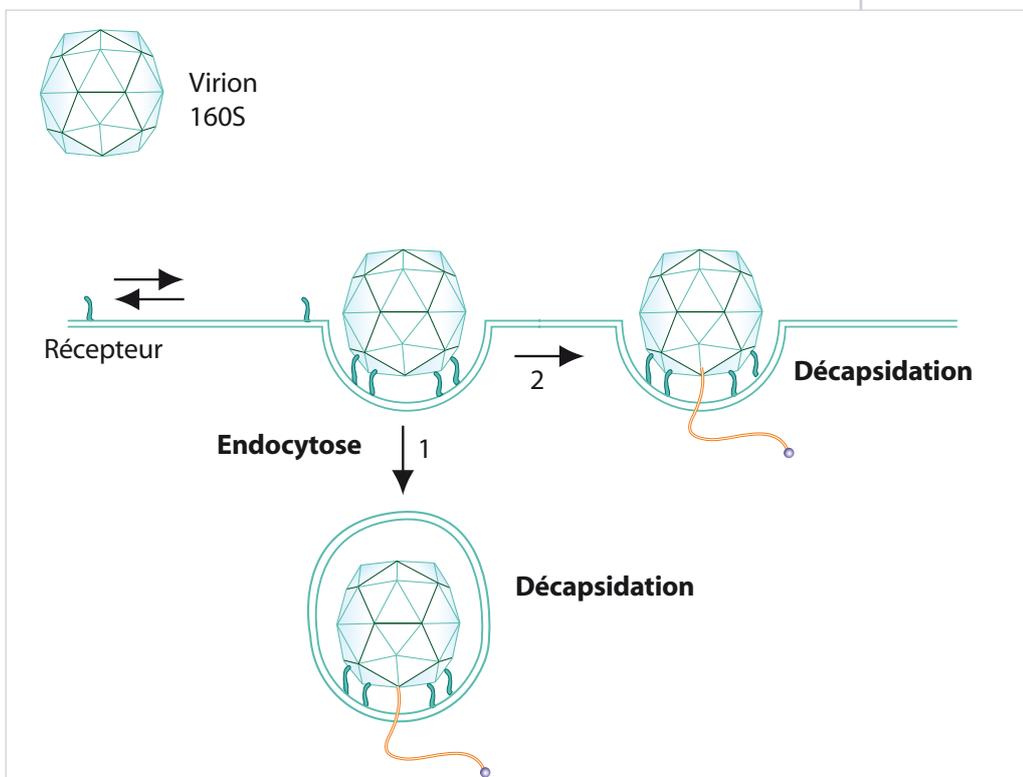
Le génome viral comporte, dans l'ordre: a) une région 5' non-codante (5'NC) comportant une structure en feuille de trèfle (près de l'extrémité 5') et l'IRES; b) Le cadre de lecture codant la polyprotéine virale, schématisé par un rectangle; et c) une région 3'NC qui se termine par une queue de polyA faisant constitutivement partie du génome viral. La petite protéine VPg (= protéine 3B) est liée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome viral.

La séquence CRE est une séquence d'ARN codante, formant une structure secondaire requise pour l'initiation du processus de réplication de l'ARN viral.

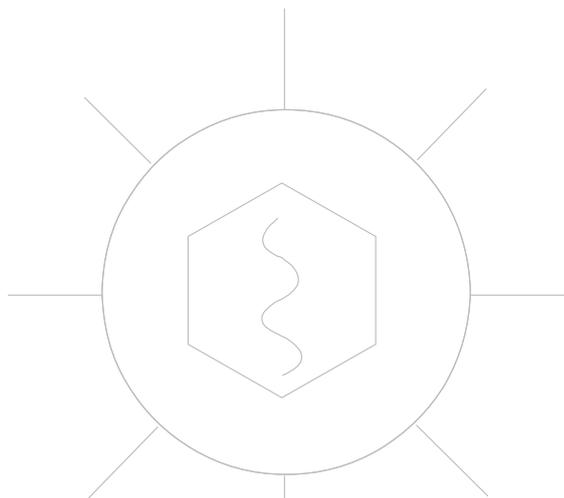
4. Cycle de réplication

a. entrée

La reconnaissance du récepteur est assurée par la capsidie du virus. Pour certains picornavirus (virus polio), on pense que l'interaction avec le récepteur enclenche un processus d'endocytose et que l'injection du génome à travers la membrane cellulaire se produit très précocement lors de la formation de l'endosome. Pour d'autres (certains rhinovirus), la décapsidation survient nettement plus tard, induite par la baisse de pH de l'endosome. La décapsidation se produirait par une série de changements de conformation de la capsidie. Dans tous les cas, l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme de la cellule.

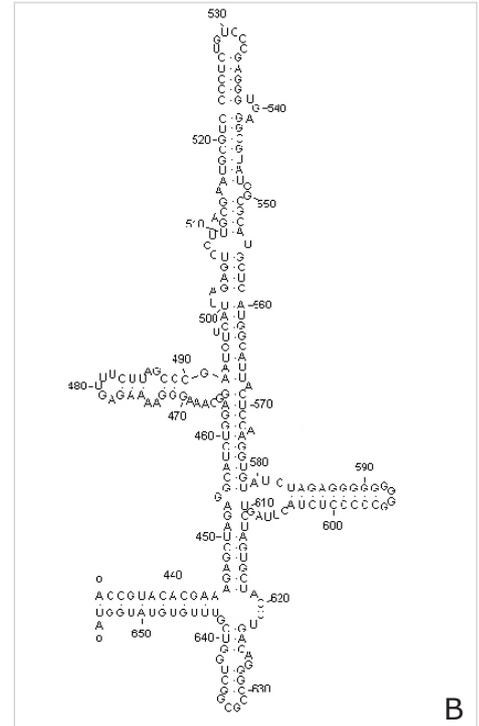
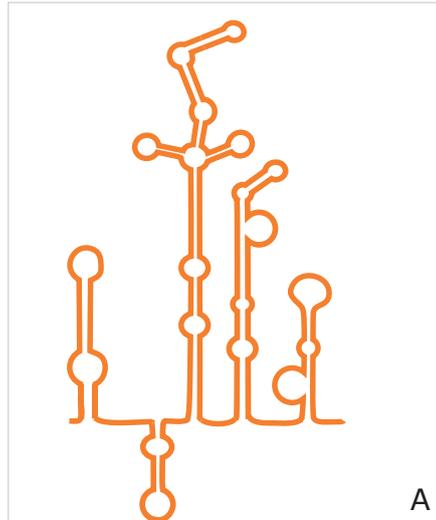


V.6.5. Entrée du virus polio
Suite à la reconnaissance du récepteur cellulaire par la capsidie du virus (canyon pour polio et rhinovirus), la décapsidation survient, soit après endocytose (1), soit au niveau de la membrane plasmique de la cellule (2). Pour le virus polio, il semble que la décapsidation survienne entre ces 2 étapes, au tout début du processus d'endocytose. La capsidie subit une altération qui permet au génome d'être "injecté" dans le cytoplasme de la cellule.



b. Expression des protéines

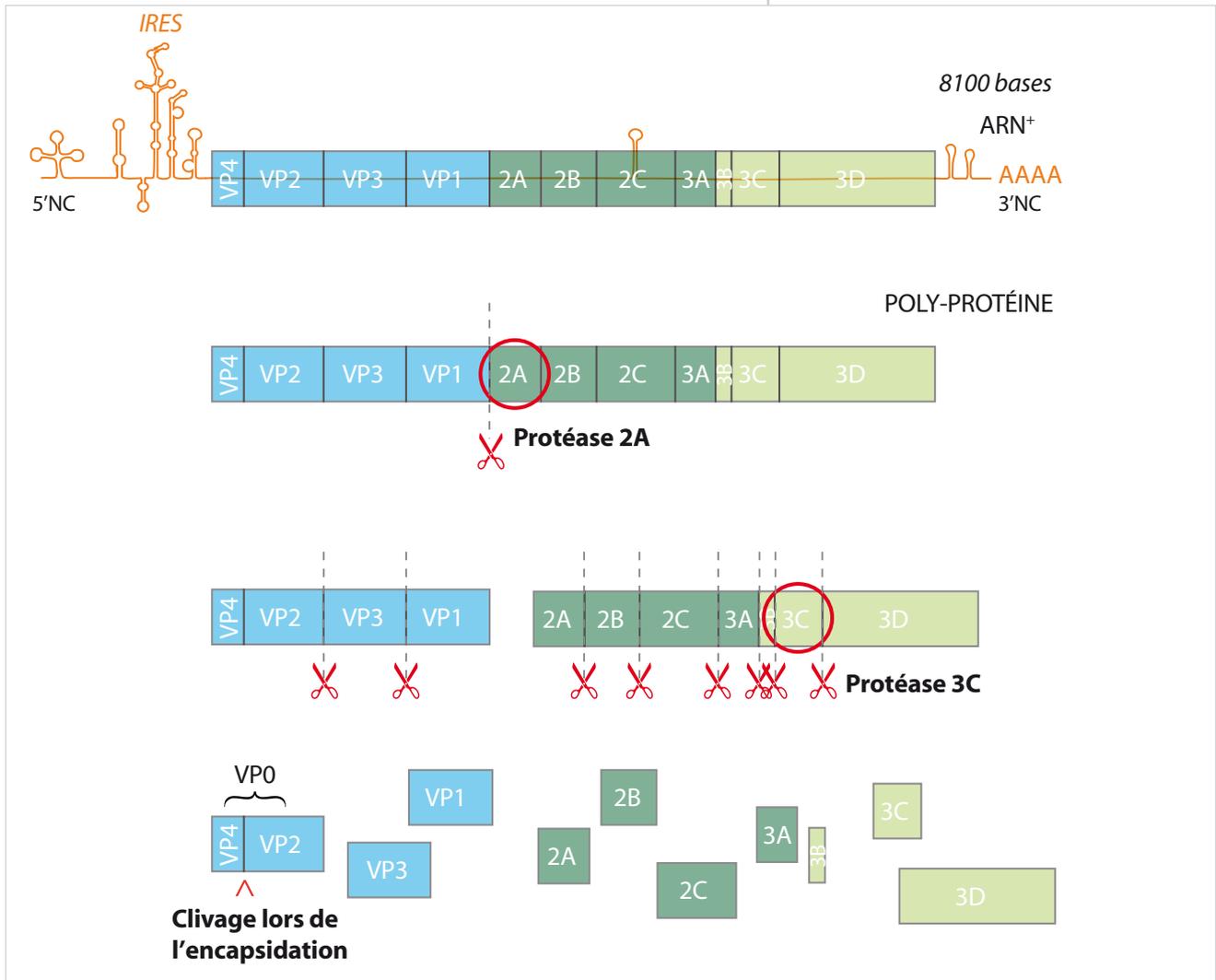
La région 5' non-codante du génome des picornavirus comporte une région d'environ 500 nucléotides permettant le recrutement des ribosomes et l'initiation de la traduction au niveau d'un codon AUG, interne à la molécule d'ARN (il n'est pas le premier codon AUG de l'ARN). Cette région, appelée IRES (internal ribosome entry site) formerait une structure secondaire qui, en association avec des facteurs cellulaires fixés sur cette structure, assurerait une entrée interne du ribosome au niveau du codon d'initiation de la traduction.



A. Structure schématique de l'IRES du virus polio. Les structures en tige-boucle sont formées par appariement de nucléotides comme illustré en (B) dans la structure prédite d'une partie de l'IRES d'un picornavirus simien. Illustration extraite de Wu et al., BMC Bioinformatics 2009, 10:160doi:10.1186/1471-2105-10-160

V.6.6. Structure d'un IRES

La grande ORF de l'ARN viral est traduite sous forme d'un précurseur polypeptidique ("polyprotéine") de plus de 2000 acides aminés. Cette polyprotéine est découpée en ses différents constituants (11 ou 12 protéines) par différentes protéases virales (2A et 3C pour le virus polio). Les protéines VP1, VP2, VP3 et VP4 forment la capside du virus.

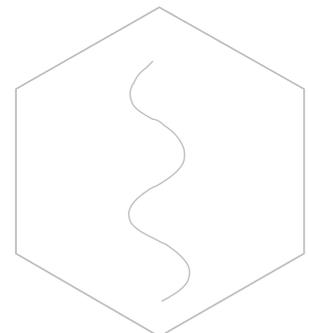


Chez les entérovirus, la protéine 2A est une protéase. Elle clive la polyprotéine au niveau de la jonction entre la protéine de capsid VP1 et 2A elle-même. Ensuite, la protéase 3C clive les autres protéines, à l'exception de la protéine VP0, qui est scindée en VP4 et VP2 lors de la maturation de la capsid, par une activité protéolytique non-identifiée. La maturation de la polyprotéine diffère partiellement entre picornavirus. De plus, certains de ces virus codent une protéine supplémentaire, dérivée de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine et appelée leader ou L.

V.6.7. Maturation de la polyprotéine du virus polio
Après la traduction de l'unique ORF, une polyprotéine d'environ 2000 acides aminés est formée. Un premier clivage est assuré par la protéase 2A, qui clive entre VP1 et 2A, séparant ainsi les protéines impliquées dans la formation de la capsid et les protéines impliquées dans la réplication et l'interaction avec la cellule hôte. Les autres clivages sont assurés par la protéase 3C, à l'exception de la scission de VP0 en VP4 et VP2 qui est due à une activité protéolytique non-identifiée et survient au moment de l'encapsidation.

Variations du clivage de la polyprotéine des picornavirus

► Pour en savoir +
[<http://www.virologie-uclouvain.be>] (Figure V.6.8)

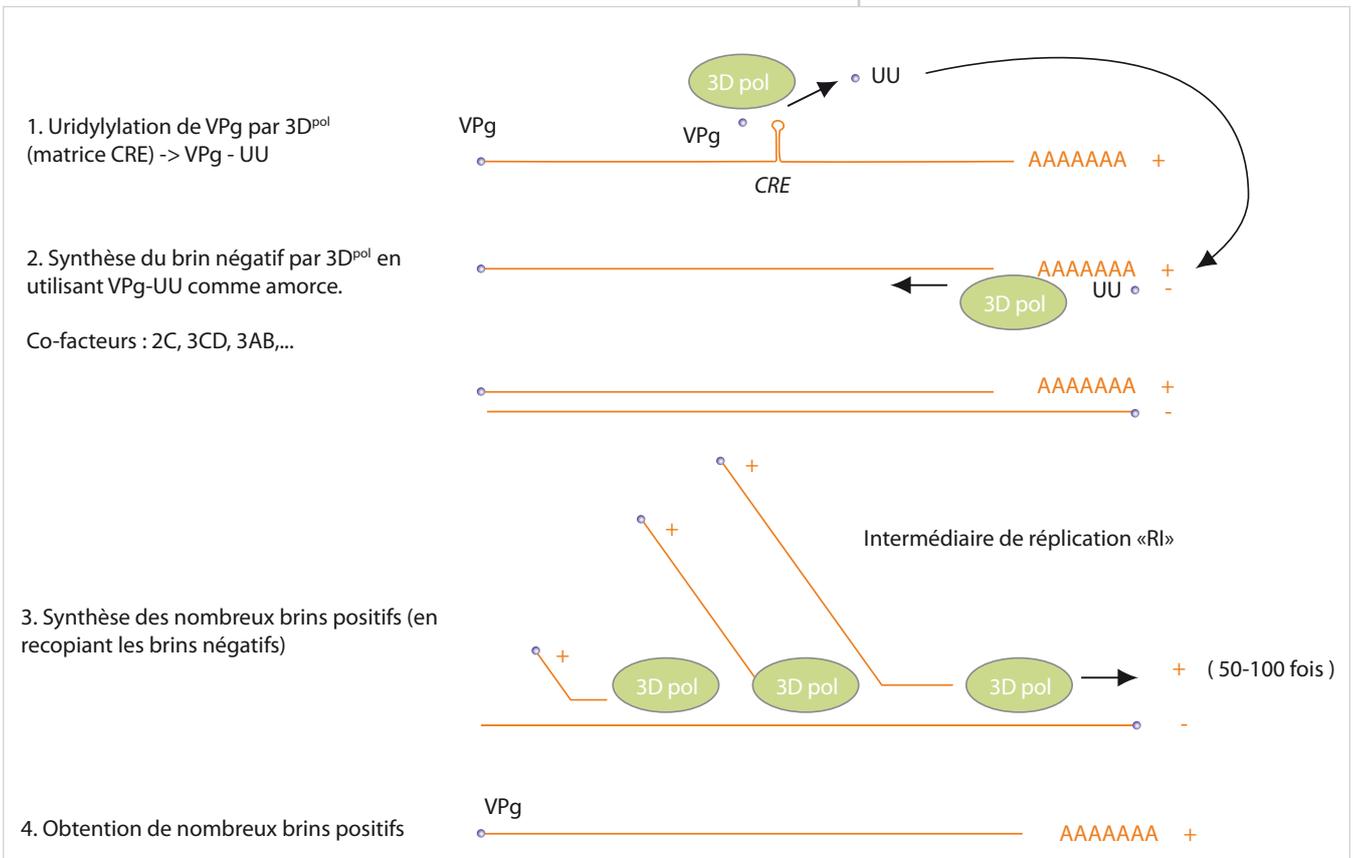


La protéine 3B est la protéine VPg qui est fixée à l'extrémité 5' du génome. La protéine 3D est la polymérase responsable de la réplication de l'ARN viral. Les protéines 2B, 2C et 3A participent vraisemblablement à la formation et au fonctionnement du complexe de réplication de l'ARN. Leur rôle précis n'est pas connu.

La protéine L, exprimée par les *Cardiovirus* et les *Aphthovirus*, est une protéine non-structurale qui inhibe notamment la réponse interféron α/β de l'hôte.

c. Réplication:

La réplication des picornavirus se déroule dans des structures membranaires dérivées du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi voire même de vésicules d'autophagie induites par le virus. La réplication est assurée par l'ARN-polymérase ARN-dépendante 3D, avec l'aide des autres protéines qui participent au complexe de réplication (2B, 2C, 3A, 3B, 3C + certains précurseurs comme 3AB ou 3CD). La réplication comporte la synthèse d'un brin d'ARN négatif à partir de la matrice positive et ensuite la synthèse de nombreux brins d'ARN + à partir de chaque molécule d'ARN - (rapport ARN+/ARN- = 60 à 100).



V.6.9. Réplication du génome des picornavirus.

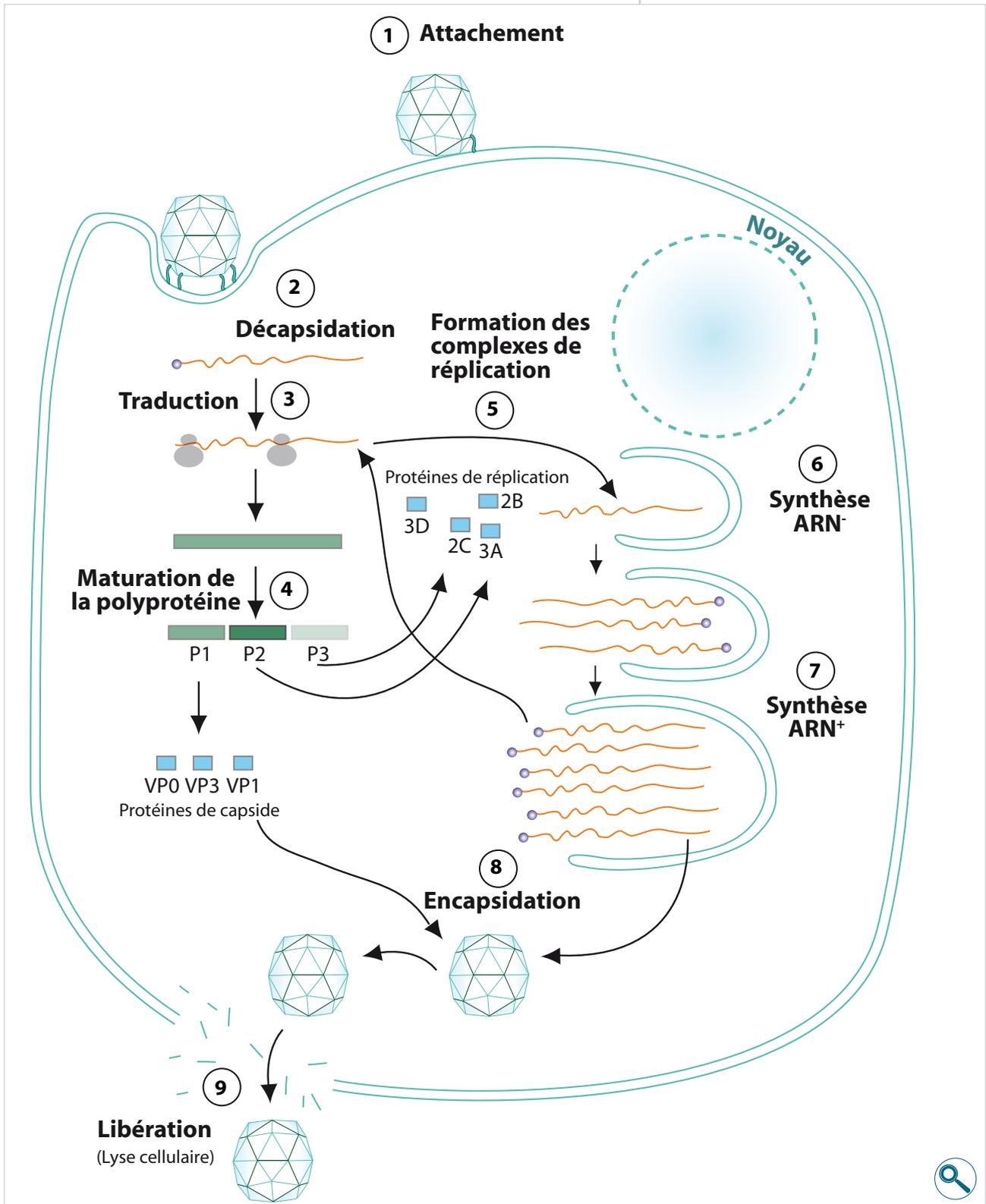
1) La polymérase uridyle la protéine VPg, en utilisant la séquence CRE comme matrice. Elle forme ainsi VPg-pUpU.

2) VPg-pUpU s'apparie à la séquence polyA et sert d'amorce à la synthèse du brin négatif.

3) le brin négatif sert ensuite de matrice pour la formation de nombreux brins positifs. Au cours de cette synthèse apparaît une structure appelée "intermédiaire de réplication" (RI) comportant de l'ARN partiellement sous forme de double brin.

d. Assemblage

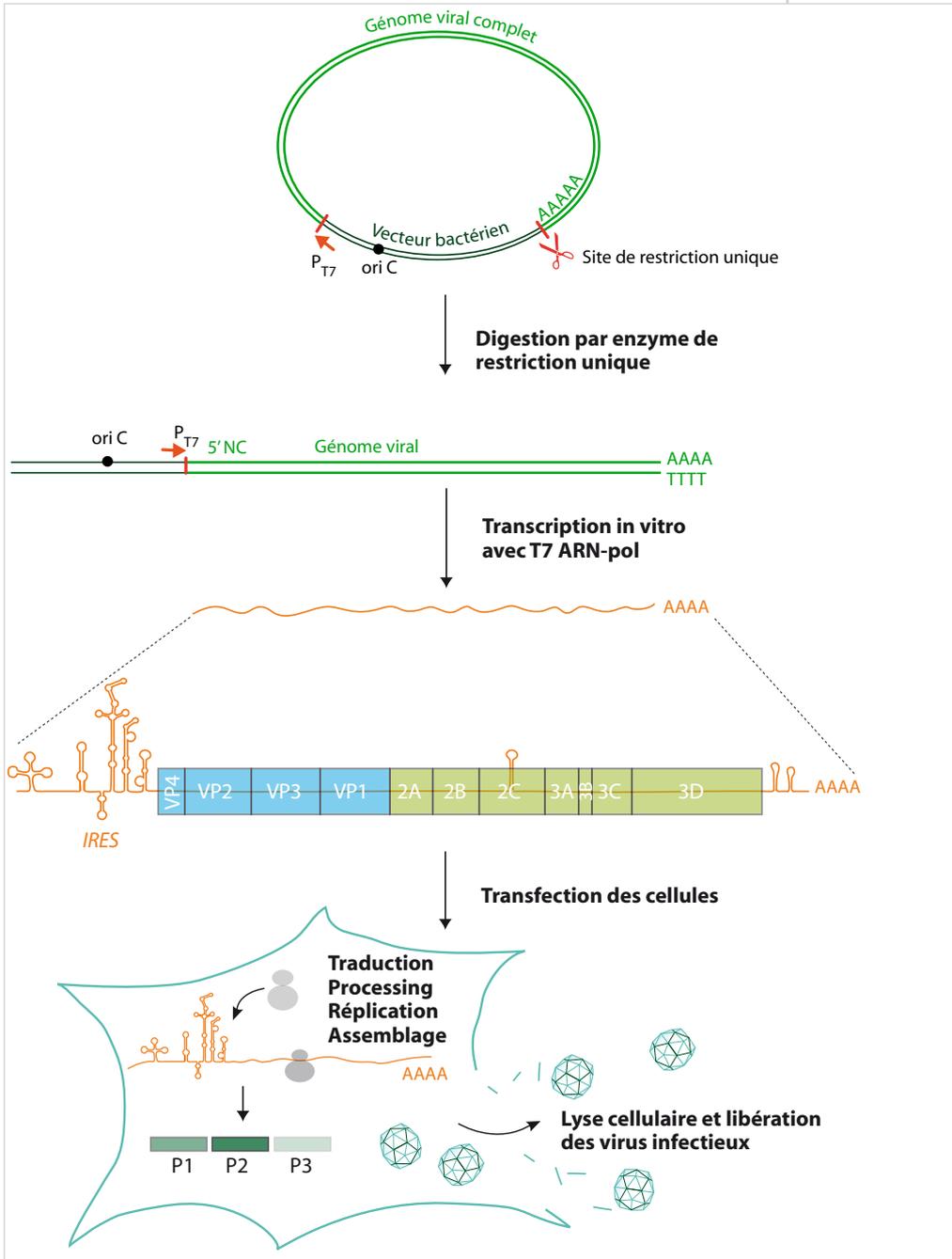
Les molécules d'ARN synthétisées sont alors encapsidées et le virus est libéré par lyse des cellules infectées.



V.6.10. Cycle de réplication des Picornavirus

Pour obtenir les schémas détaillés des différentes étapes:
[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

Des particularités de l'expression des protéines des picornavirus, il découle que leur génome est infectieux. En effet, d'une part le génome viral peut être directement reconnu par les ribosomes comme un ARN messager, et d'autre part toutes les protéines sont synthétisées à partir de ce messager. Après leur synthèse, ces protéines sont capables d'assurer la réplication du génome viral. L'introduction de l'ARN viral "nu" dans une cellule suffit donc à enclencher le cycle de réplication du virus. Cette propriété facilite énormément les manipulations génétiques des picornavirus. D'autre part, elle explique que la polymérase de ces virus n'a pas besoin d'être présente dans les virions.

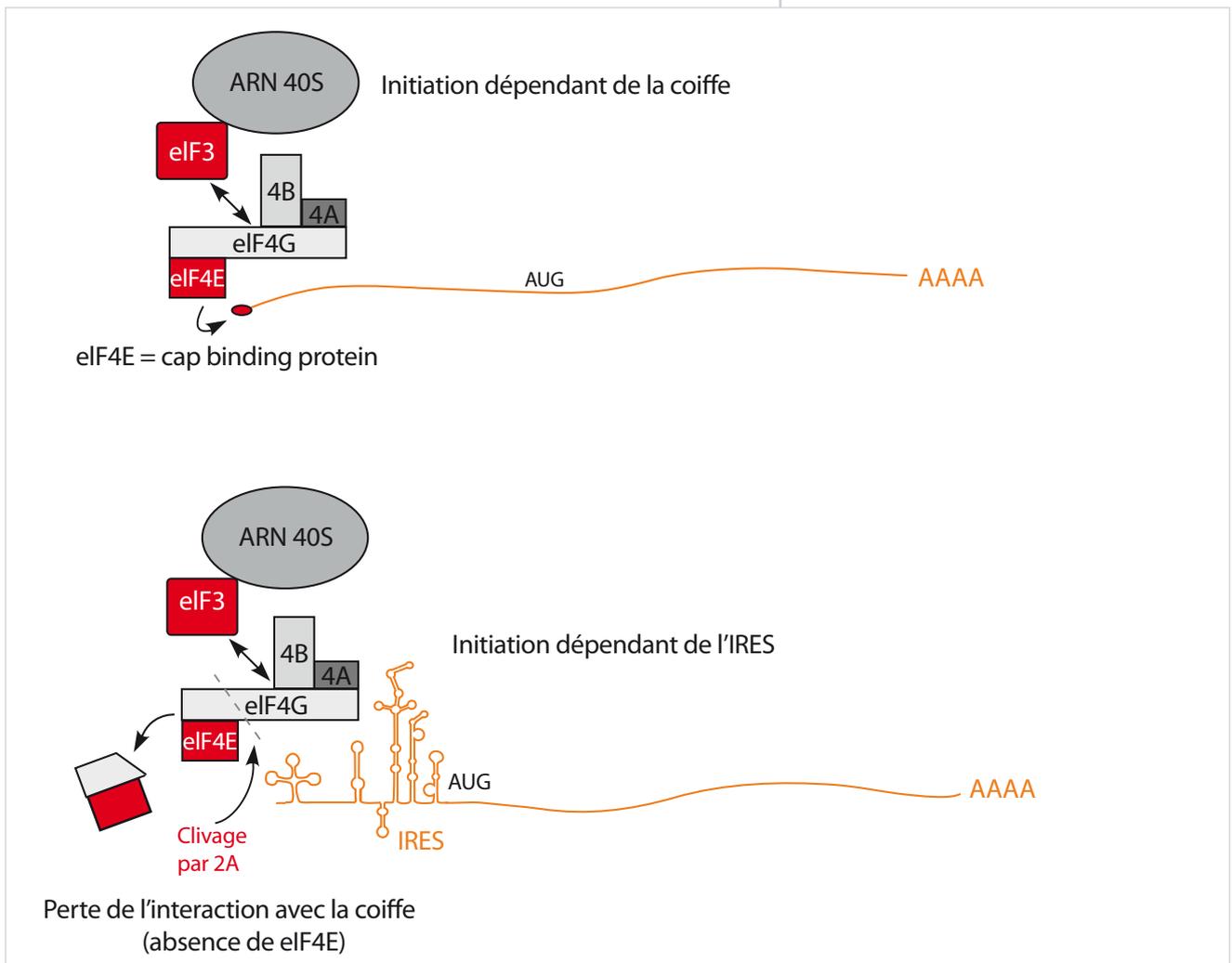


V.6.11. Génétique inverse: exemple.

Le génome viral est cloné sous forme de cDNA dans un plasmide, entre un promoteur de transcription du bactériophage T7 et un site de restriction unique. L'ADN plasmidique est linéarisé en le digérant par cette enzyme. Ensuite, l'ARN correspondant au génome viral est transcrit *in vitro* par la polymérase de T7, en présence de ribonucléotides tri-phosphates. L'ARN transcrit *in vitro* est ensuite introduit dans une cellule eucaryote par transfection. L'IRES se forme spontanément et permet la traduction de la polyprotéine virale par les ribosomes cellulaires. La polyprotéine est maturée et le cycle viral est enclenché. Après réplication et assemblage du virus, la cellule libère des particules virales infectieuses.

5. Interaction virus-cellule: Exemple de la protéase 2A

Certaines protéines non-structurales virales interagissent avec des facteurs de l'hôte pour favoriser la réplication du virus, sa dispersion de cellule à cellule ou sa transmission. Par exemple, la protéase 2A du virus polio a pour fonction primaire de cliver la polyprotéine virale entre VP1 et 2A. 2A clive également le facteur d'initiation de la traduction eIF4G de sorte que eIF4G perde la capacité de guider la petite sous-unité du ribosome vers la coiffe des ARNs messagers.



V.6.12. Shut-off de la synthèse des protéines cellulaires par la protéase 2A du virus polio

(dessus) La traduction des ARN messagers cellulaires fait intervenir le complexe d'initiation de la traduction représenté. La protéine eIF4G y joue un rôle d'échaffaudage. La petite sous-unité du ribosome, associée au facteur eIF3, est recrutée par l'interaction de eIF3 avec eIF4G. Par ailleurs, eIF4E qui interagit aussi avec eIF4G, est la protéine qui assure la reconnaissance de la coiffe des ARNs messagers et permet donc la reconnaissance de ceux-ci par la petite sous-unité du ribosome. Celle-ci "scanne" alors l'ARNm à la recherche du codon d'initiation de la traduction.

(dessous) La protéase 2A du virus polio clive le facteur eIF4G, dissociant ainsi le complexe de reconnaissance de la coiffe (via eIF4E) et le complexe d'initiation de la traduction (ribosome + eIF4G/4B/4A). Ce dernier ne reconnaît donc plus les ARNm cellulaires mais conserve la capacité de reconnaître l'IRES du virus et d'initier la traduction du génome viral.

6. Quasi-espèces et "fitness"

Les **polymérase ARN-dépendantes** ne possèdent pas d'activité de relecture (exonucléase 3'-5'). Dès lors, ces polymérase sont enclines à incorporer des nucléotides erronés au cours des cycles de réplication du génome. On estime le taux d'erreur de la polymérase du virus polio à environ 1 nucléotide sur 10 000 (soit presque une erreur par génome). La population de virus qui infecte un organisme correspond donc à une multitude de virus dont le génome varie très légèrement. Cette population hétérogène en terme de séquence nucléotidique forme ce que l'on nomme "quasi-espèce". Globalement, la séquence type du virus, autour de laquelle s'établit cette variation, change très peu.

Quasi-espèce: un taux de variation très adapté.

► Pour en savoir +

[<http://www.virologie-uclouvain.be>]

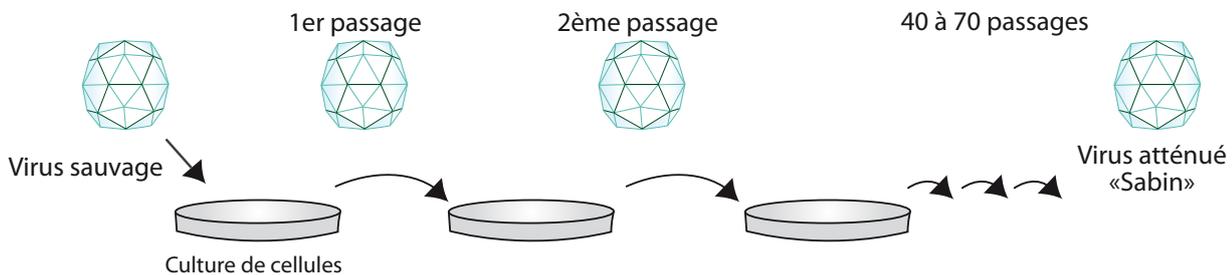
7. Eradication du virus polio

Un des objectifs à court terme de l'OMS est d'éradiquer le virus de la poliomyélite, comme cela a été fait par le passé pour le virus de la variole. Il existe deux types de vaccins dirigés contre le virus polio: le vaccin "Salk" constitué d'un mélange des trois sérotypes de virus sauvages inactivés et le vaccin "Sabin" qui est un vaccin vivant atténué. Ce dernier comporte une souche de chacun des trois sérotypes de virus polio dont la virulence est atténuée par la présence de mutations ponctuelles dans le génome (notamment au niveau de l'IRES).



V.6.13. Jonas Salk (développement du vaccin inactivé) et Albert Sabin (développement du vaccin vivant atténué).

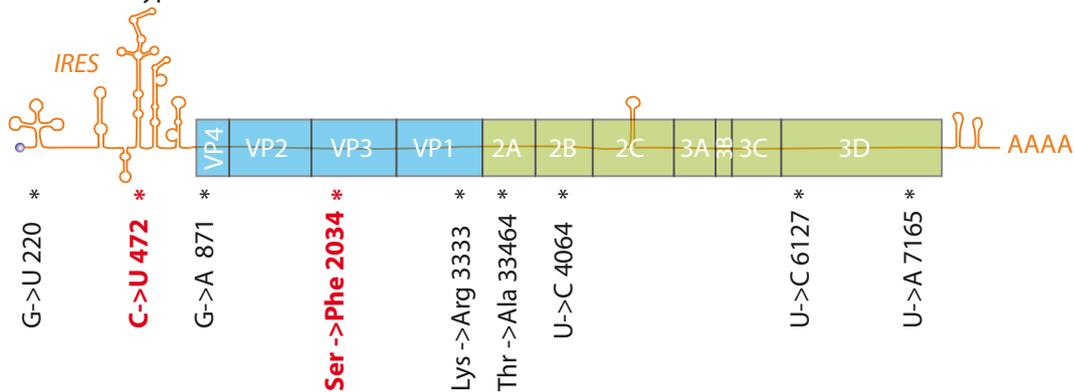
Pour les 3 sérotypes de virus polio :



V.6.14. Développement du vaccin atténué "Sabin".

Pour chacun des trois sérotypes du virus polio, le virus a été passé successivement sur une série de cellules en culture *in vitro* (1 "passage" = infection de la culture puis récolte du virus après le cycle d'infection). Au terme de 40 à 70 passages, les mutations permettant au virus de s'adapter à la culture cellulaire modifient sa capacité à infecter l'homme et atténuent sa virulence.

Mutations type 3 Leon -> Sabin 3



V.6.15. Développement du vaccin atténué "Sabin".

9 mutations de nucléotides sont apparues dans le génome du virus polio type 3 (Leon) lors de l'obtention du virus atténué "Sabin 3". L'analyse de virus recombinants formés par génétique inverse a montré que parmi ces 9 mutations, 2 sont principalement responsables de l'atténuation du virus: la mutation C->U en position 472, localisée dans l'IRES du virus et une mutation qui convertit la Serine 34 de la protéine de capsid VP2 en Phénylalanine.

Le vaccin "Salk" a l'avantage de la sécurité mais il doit être administré à plusieurs reprises, par injection. Le vaccin "Sabin" a l'avantage de l'efficacité d'un vaccin vivant (une faible dose administrée une seule fois par voie orale suffit pour procurer une immunité durable). Néanmoins, une seule administration ne suffit pas toujours à générer une bonne immunité contre les trois sérotypes du virus présents dans le vaccin.

Un problème important lié à l'utilisation d'un vaccin vivant atténué (capable de se répliquer chez le sujet vacciné) est le fait que ce virus peut rapidement "réverter" et donner du virus sauvage qui est excrété par la personne vaccinée. Ceci peut entraîner une poliomyélite associée au vaccin (Vaccine Associated Paralytic Poliomyelitis ou VAPP) chez un contact non immun, dans une vaccination sur un million. Ce petit risque a entraîné le passage en l'an 2000 au vaccin Salk inactivé pour la vaccination systématique en Belgique, pays où la poliomyélite « sauvage » a disparu.

Une autre limite liée au vaccin atténué de type Sabin est l'existence de recombinants avec du virus sauvage, qui ont été la source de certaines épidémies. Il est donc probable qu'il faudra passer à du vaccin inactivé de type Salk en fin de campagne d'éradication.

Actuellement, on se rend compte que dans les dernières régions affectées, le vaccin oral semble moins efficace, nécessitant souvent 5 doses pour arriver à une immunité satisfaisante. On envisage d'utiliser des vaccins monovalents, contenant soit le type 1 soit le type 3, pour augmenter l'efficacité des campagnes.

Pour accéder au site internet de la campagne d'éradication : [\[http://www.polioeradication.org\]](http://www.polioeradication.org)

Vu son très faible coût de production et l'excellente immunité qu'il engendre, le vaccin vivant atténué (Sabin) a été choisi pour la campagne d'éradication de l'OMS. Les facteurs qui permettent d'espérer l'éradication complète du virus sont les suivants :

- le virus polio n'infecte que l'homme. Aucun réservoir animal n'est connu.
- l'instabilité relative du virus dans l'environnement
- l'existence d'un vaccin efficace et peu coûteux.
- l'immunité durable contre le virus.

La mise en oeuvre de la campagne d'éradication comporte :

- une vaccination routinière largement répandue dans le monde
- des doses vaccinales supplémentaires délivrées dans les pays moins bien couverts par la vaccination, lors de "journées nationales d'immunisation"
- des vaccinations systématiques de la population lors d'apparition de foyers de poliomyélite.

Les résultats de cette campagne ont été remarquables: en dix ans, le nombre de cas de poliomyélites est passé de 35 000 (en 1988) à environ 5000 (1997). Depuis lors, le nombre de cas a encore fortement diminué pour se stabiliser aux environs de 1000 à 1500 cas par an ces dernières années. Apparemment le sérotype 2 du virus a déjà disparu.

Grâce à ces efforts déployés par l'OMS, plusieurs continents (Europe, Amérique) ont déjà pu être déclarés "dépourvus de virus polio", les régions où persistent des foyers d'infection correspondant essentiellement à des régions instables du point de vue politique (Inde, Pakistan, Nigeria, Afghanistan).

En cas d'éradication durable du virus, l'OMS entrevoit la possibilité d'arrêter la vaccination pour pouvoir porter ses efforts sur une autre pathologie. Cependant, l'arrêt de la vaccination pose de nombreuses questions quant à sa faisabilité.

- arrivera-t-on à éliminer totalement la circulation du virus? (persistance chez certaines personnes immunodéprimées)
- l'homme est-il le seul porteur potentiel du virus?
- comment arrêter la vaccination si le vaccin vivant utilisé provoque l'excrétion de virus sauvage.
- quels sont les risques de ré-introduction accidentelle (ou volontaire) du virus?

