

La grippe saisonnière est causée par le virus de l'influenza de type A qui a un génome segmenté, composé de 8 ARN simple brin (négatifs) différents encapsidés et enveloppé par une bichouche lipidique. Une réplicase de 3 sous unités et codée par 3 parmi les 8 ARN est incluse dans la capsid avec les ARN.

Table 1
The genomic segments of influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus and their encoded proteins

Segment	Segment length in nucleotides	Encoded protein(s)	Protein length in amino acids	Protein function
1	2341	PB2	759	Polymerase subunit; mRNA cap recognition
2	2341	PB1	757	Polymerase subunit; RNA elongation, endonuclease activity
		PB1-F2	87	Pro-apoptotic activity
3	2233	PA	716	Polymerase subunit; protease activity
4	1778	HA	550	Surface glycoprotein; major antigen, receptor binding and fusion activities
5	1565	NP	498	RNA binding protein; nuclear import regulation
6	1413	NA	454	Surface glycoprotein; sialidase activity, virus release
7	1027	M1	252	Matrix protein; vRNP interaction, RNA nuclear export regulation, viral budding
		M2	97	Ion channel; virus uncoating and assembly
8	890	NS1	230	Interferon antagonist protein; regulation of host gene expression
		NEP/NS2	121	Nuclear export of RNA

The PB2, PA, HA, NP and NA proteins are each encoded on a separate RNA segment. The M2 and NEP are both expressed from spliced mRNAs, while PB1-F2 is encoded in a +1 alternate reading frame (kindly provided by Megan L. Shaw).

<http://bionumbers.hms.harvard.edu/files/The%20genomic%20segments%20of%20influenza%20A.pdf>

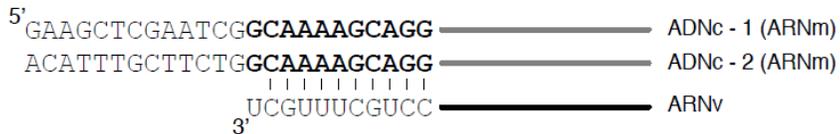
- 1- Expliquer la signification du terme « ARN négatif » et définir le rôle de la réplicase.
- 2- Les huit ARNs ont été purifiés. En utilisant les données du tableau proposer une méthode expérimentale pour séparer les ARN les uns des autres dans la mesure du possible.

On effectue une traduction in vitro des ARNs viraux (selon les conditions décrites dans différents tubes dans le tableau) dans un lysat de cellules humaines (réticulocytes) contenant tous les composants nécessaires à la traduction (ribosomes, facteurs, ARNt, acides aminés, nucléotides...) et dépourvu d'ARNm. Tous les tubes contiennent les ARN viraux et le lysat de cellules humaine. Les autres variables sont indiquées pour chaque tube. Les chiffres représentent des valeurs absolues des protéines virales synthétisées.

Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7	Tube 8
Mg2+	Réplicase	Mg2+ et Réplicase	Mg2+ et réplicase et ARNm provenant de bactéries	Mg2+ et réplicase et ARNm provenant de levure	Mg2+ et réplicase et ARNm provenant de cellules humaines	Reverse transcriptase et ARNm provenant de cellules humaines	ARN polymérase II et ARNm provenant de cellules humaines
0	1	10	10.1	1450	1465	0.5	0.6

- 3- Quel est l'objectif général de cette expérience ?
- 4- Pourquoi n'a-t-on pas de protéines virales produites dans le tube 1 ? Suggérer un rôle du magnésium.
- 5- Si la particule virale n'avait pas eu la réplicase, quelle conséquence on aurait eu en termes de pathogénicité ?
- 6- Conclure en vous basant sur les résultats obtenus avec les tubes 3, 4, 5, 6 concernant les prérequis qui permettent la synthèse des protéines virales.
- 7- Quels sont les éléments indispensables que doit posséder un ARN messager pour pouvoir être traduit dans une cellule eucaryote ? A quel moment ces éléments sont-ils ajoutés aux ARNm ? (question de cours)
- 8- Les réticulocytes utilisés pour faire le lysat de traduction in vitro sont des cellules dépourvues de noyau. Les activités enzymatiques spécifiques du noyau sont donc absentes. Que pouvez vous en conclure sur l'incorporation des éléments nécessaires à la traduction des ARN messagers viraux ?
- 9- Y-a-t-il une explication logique pour les résultats obtenus dans les tubes 7 et 8 ?

- 10- Une partie du contenu des tubes 5 et 6 est utilisée pour réaliser une co-immunoprécipitation avec des anticorps anti-eIF4E. On analyse alors les ARN présents dans le précipité, parmi ceux-ci on trouve les ARNm viraux. Que pouvez-vous en conclure ? En quoi est-ce que ça explique en partie la production de protéines virales ?
- 11- Des ARNm messagers viraux purifiés à partir de cellules infectées par le virus ont été séquencés. Quelle enzyme utilise-t-on sur les ARN avant de procéder au séquençage proprement dit ?
- 12- Les séquences de deux ADNc obtenus sont :



Il y a une extension de 13 nucléotides, au delà de l'extrémité 3' de l'ARNv complémentaire.

- 13- Faire une synthèse des idées des questions précédentes, proposez un mécanisme expliquant l'origine de cette extension ? Pourquoi est-elle variable d'un ADNc isolé à l'autre ?
- 14- La réplicase virale possède une activité endonucléase, capable de couper l'ARN simple brin, à quoi pourrait-elle servir dans ce mécanisme ?
- 15- L'une des protéines du virus de la grippe interagit avec la protéine CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) dans le noyau et en bloque le fonctionnement normal. Quel est l'impact de ce mécanisme sur la cellule infectée et quel est l'avantage pour le virus ?