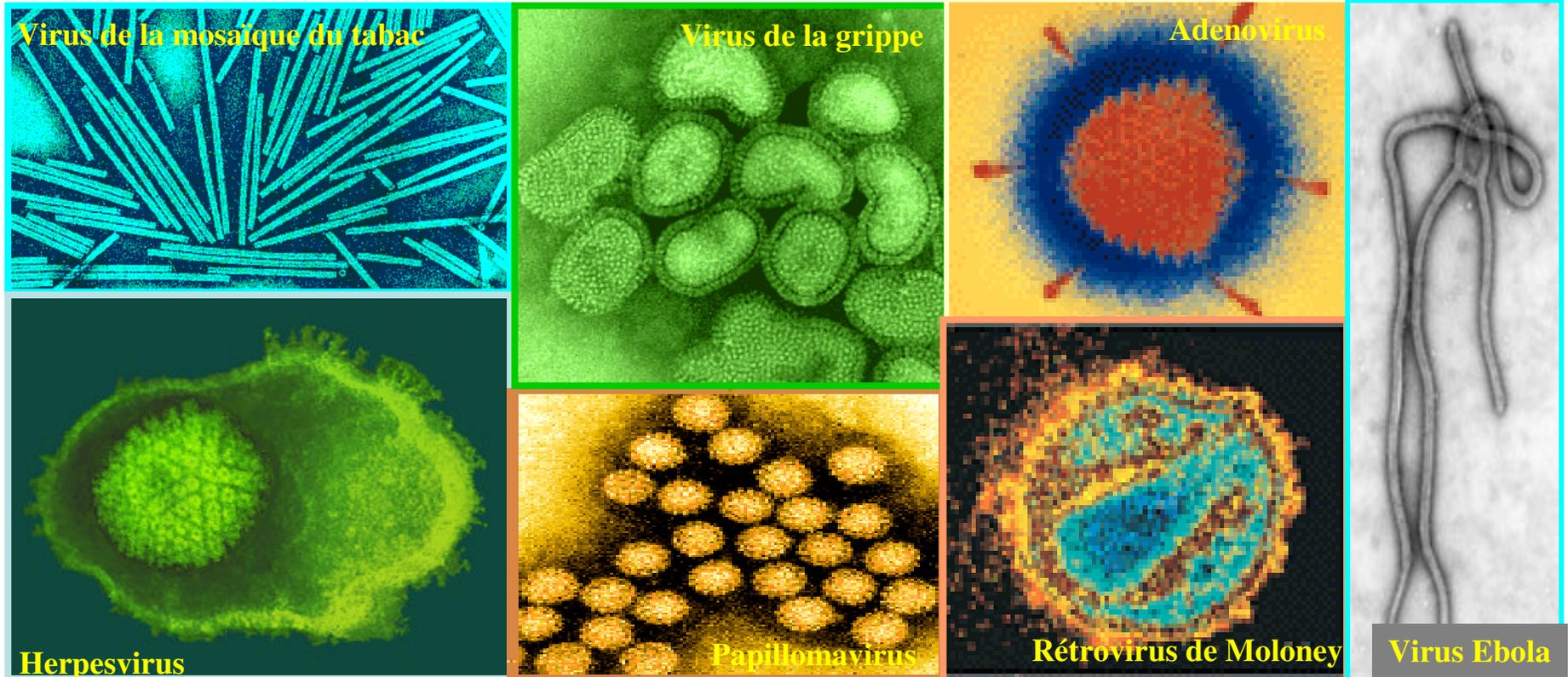


# Cours de Virologie

## 3<sup>ème</sup> année Pharmacie



Philippe Georgel

[philippe.georgel@pharma.u-strasbg.fr](mailto:philippe.georgel@pharma.u-strasbg.fr)

**Intérêt  
médical**  
60% des  
maladies  
infectieuses



# Virologie

**Intérêt  
fondamental**  
modèle de biologie  
moléculaire

**Intérêt en génie génétique**  
vectorologie, thérapie génique, vaccination

## Virologie et intérêt médical en quelques chiffres...

Maladies infectieuses : 17 millions de décès par an soit 1/3 de la mortalité humaine

6 maladies représentent 90% des décès par infection dans le monde :

<b>Maladies respiratoires</b> bactériennes (pneumocoque) et <b>virales</b> (grippe, virus respiratoire syncytial)	3 millions de décès / an
<b>Syndrome d'immunodéficience humaine acquise</b> (SIDA dû au <b>HIV</b> )	3 millions de décès / an
<b>Diarrhées</b> bactériennes (shigellose, colilose, choléra, fièvre typhoïde) ou <b>virales</b> (rotavirus)	2,5 millions de décès / an
<b>Tuberculose</b> ( <i>Mycobacterium tubertulosis</i> )	~ 2 millions de décès / an
<b>Paludisme</b> ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	~ 1 million de décès / an (300 à 500 millions de cas annuels)
<b>Rougeole</b>	~ 900 000 de décès / an (alors qu'il existe un vaccin efficace!)

Plus de 90% de ces maladies surviennent dans les pays en développement : l'Organisation Mondiale de la Santé, dans son " *Rapport sur la santé dans le monde, 2002* " estimait que plus d'un milliard de personnes étaient privées de " révolution sanitaire "

Au moins 16% des cancers sont d'origine infectieuse : bactérienne (*Helicobacter pylori*...) ou virale (virus des hépatites, virus d'Epstein Barr, papillomavirus...)

# Intérêt médical de l'étude des virus

Les virus sont responsables de nombreuses maladies (animaux, végétaux, bactéries, algues, champignons, ...)

Chez l'homme, >60% des maladies infectieuses sont d'origine virale :

- Bénignes : bronchiolites (*Adenovirus*), rhinites (*Rhinovirus*)
- Sévères et mortelles : Fièvres hémorragiques (Ebola), SIDA (HIV)

De telles maladies peuvent se transformer en de véritables épidémies et pandémies comme la grippe espagnole (1917-1919), le SIDA ou l'hépatite C.

Chez les plantes, de telles épidémies ont des conséquences économiques importantes.

# Virologie et génie génétique

## **Bactériophages, outils de génie génétique**

Vecteurs de clonage ou d'expression (ex :  $\lambda$ , M13)

Vecteur de séquençage, mutagenèse dirigée (ex : M13)

Enzymes (T4 ligase, ARN polymérase ADN dépendante de T7, ...) ou promoteurs (T7, T3) de phages

## **Virus eucaryotes, outils de biologie moléculaire**

Vecteurs d'expression de protéines dans des cellules eucaryotes en culture (ex : SV40, Baculovirus, Rétrovirus...)

Enzymes (RT) ou promoteurs (promoteur 35S du CaMV, *enhancer* de SV40) viraux

## **Virus eucaryotes, outils thérapeutiques**

Vaccinologie

Thérapie génique

# Principaux virus utilisés en thérapie génique

Systemes	Avantages	Inconvénients	Remarques
<b>Rétrovirus</b> (entre 2 LTR en aval de la séquence d'encapsulation F, insertion du gène d'intérêt en remplacement des gènes gag, pol et env – encapsidation après transfection d'une lignée cellulaire transcomplémentantes – ex : HIV, MoMLV)	Forte efficacité de transduction – entrée efficace dans les cellules cibles – large spectre de cellules infectables possible – <b>intégration stable</b> – incapacité à se propager seul (virus défectif) – système très bien étudié – immunogénicité faible – pas de protéines virales exprimées par l'hôte	Faible titre ( $10^6$ - $10^7$ pfu/ml) – limite de taille de l'insert (<7 Kb) – expression difficile à contrôler – <b>infection limitée à des cellules en division</b> pour les dérivés d'oncorétrovirus – genèse potentielle de dommages génétiques ( <b>intégration au hasard</b> : potentiel oncogénique) – assez faible biodisponibilité <i>in vivo</i> – extinction de l'expression au cours du temps - coût et complexité de préparation et d'évaluation	Beaucoup d'expériences ont été menées – utilisés surtout pour des études de marquage cellulaire et des traitements contre le cancer et le SIDA
<b>Adénovirus</b> (ex : délétion de la région précoce E1A et E1B et de la région E3 afin d'insérer le gène d'intérêt – le virus est encapsidé grâce à une lignée cellulaire transcomplémentantes ayant intégré de façon stable E1A et E1B – ex : sérotype 2 et 5 du groupe C)	Forte efficacité de transduction – relative innocuité – <b>capacité à infecter des cellules post-mitotiques</b> – titre élevé ( $10^{10}$ - $10^{13}$ pfu/ml) – en général, <b>pas d'intégration</b> (forme épisomique) – large spectre de cellules infectables – incapacité à se propager seul (virus défectif) – virus peu pathogène pour l'homme	<b>Expression instable</b> dans les cellules mitotique car reste sous forme épisomique (dilution au fil des divisions) – <b>très immunogène</b> : altération de la biodisponibilité <i>in vivo</i> – limite de taille de l'insert (<9Kb) – protéines virales exprimées par l'hôte après infection – reconstitution <i>in vivo</i> de virus recombinants infectieux	L'utilisation de vecteurs adénoviraux semble supplanter celle des vecteurs rétroviraux – Utilisés pour le traitement de cancers et de maladies monogéniques telles que la mucoviscidose, la dystrophie...
<b>AAV</b> ( <i>adeno-associated virus</i> )	Intégration site spécifique de l'AAV naturel : expression stable, non oncogénique	Nécessite la présence d'un adénovirus <i>helper</i> pour croître – taille de l'insert très limitée – l'intégration spécifique nécessite sans doute l'expression de protéines virales	Quantité modérée d'expériences menées – Lutte contre certaines maladies monogéniques et le cancer.
<b>Herpesvirus</b>	Haut titre ( $10^9$ pfu/ml) – <b>grand insert</b> possible (>30Kb) – fonctionnement dans des cellules <b>post-mitotiques</b> – <b>neurotrophique</b> – <b>pas d'intégration</b> mais peuvent se maintenir sous forme épisomique (état latent, unité de transcription LAT)	Pas d'utilisation dans des cellules à multiplication rapide – construction complexe – pas de lignée cellulaire d'encapsulation disponible – problèmes de dissémination et de cytotoxicité du vecteur	Relativement peu d'expériences menées – utilisation contre les maladies neurologiques
<b>Poxvirus</b>	Haut titre – grand insert possible – forte expression	Très immunogène – construction complexe – pas de lignée cellulaire d'encapsulation disponible – risques pathogènes	Quelques expériences menées – traitements <i>in vivo</i> localisés et temporaires

**Les virus sont à l'origine des découvertes fondamentales dans les domaines de la biologie (moléculaire et cellulaire) des eucaryotes et des procaryotes (réplication, transcription et traduction).**

- **fragments d'OKAZAKI dans la réplication de l'ADN : **bactériophage T4****
- **introns et l'épissage des ARN messagers eucaryotiques : **adénovirus****
- **séquences activatrices de la transcription et fonctionnement d'un promoteur : **SV40****
- **stratégies d'expression des protéines : **bactériophage, poliovirus ...****
- **proto-oncogènes qui régulent le cycle cellulaire et dont les mutations sont à l'origine des cancers : **rétrovirus****
- **extinction post-transcriptionnelle des gènes ou RNAi (système d'élimination d'ARN étrangers ou aberrants) : **virus des plantes****
- **utilisation de séquences virales comme vecteurs de gènes (vaccinologie, thérapie génique, génie génétique, ...)**

## **les virus : d'excellents modèles d'étude**

- ⇒ Leur génome renferme peu de gènes
- ⇒ L'étude des relations structures - fonction(s) peut-être réalisée facilement par mutagenèse dirigée
- ⇒ Leur multiplication est très rapide (25 minutes à 30 heures selon le virus)

## Naissance du concept de virus

Antiquité  
→ fin

Virus (« poison », latin) = tout agent à l'origine de maladies infectieuses

XIX<sup>ème</sup>  
XVII<sup>ème</sup>  
1794-6

*Antony Van Leeuwenhoek* effectue les premières observations de microbes  
*Edward Jenner* vaccine contre la variole à l'aide de pustules de virus contenus dans les pustules de la maladie assez bénigne des vachers. **Mise en place de la vaccination avant même de connaître la nature des virus**

1840

*Jacob Hense* propose l'hypothèse d'agents infectieux trop petits pour être observés au microscope et capables d'engendrer des maladies. En l'absence de preuves, l'hypothèse n'est pas retenue.

fin XIX<sup>ème</sup>

Essor de la Microbiologie avec *Louis Pasteur* et *Robert Koch*.

1876

Enoncé des Postulats de Koch permettant de définir un agent pathogène

1878

*Charles Sédillot* crée le mot « microbe » pour désigner les êtres vivants visibles seulement au microscope

1880

*Louis Pasteur* vaccine contre le choléra des poules

1885

*Louis Pasteur* vaccine *Joseph Meister* contre la rage

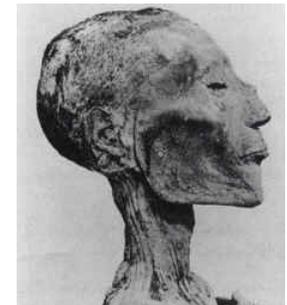
1888

Inauguration de l'Institut Pasteur

**La recherche des agents responsables de maladies virales ne répondait pas à tous les postulats de Koch : mise en évidence d'un nouveau type d'agents infectieux.**

## Un peu d'histoire...

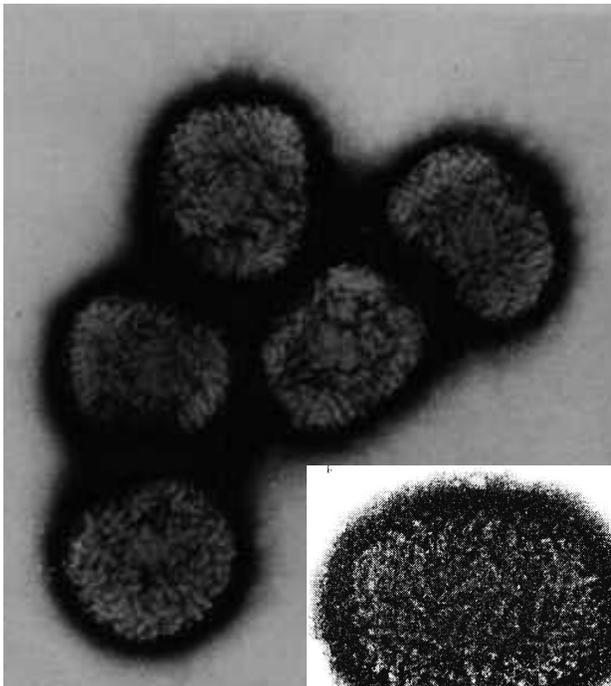
- Virus présents depuis l'origine de la vie (début de l'ère Précambien - 3,5 milliards années/Phages)
- Égypte : bas relief poliomyélite (1500 BC)
- Variole : déclin empire romain (III<sup>e</sup> s), décime 1/3 population Aztèque en 1520 (Cortes)
- Chine, Turquie (1000) : inhalation de croûtes de variole pour se prémunir de la maladie ...



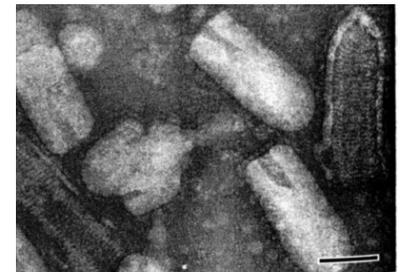
## Pratique de la vaccination avant la découverte de l'existence des virus

### *Vaccination contre la variole*

**1798 : E. JENNER** protège l'homme de la variole en lui inoculant la vaccine, une maladie voisine et bénigne de la vache



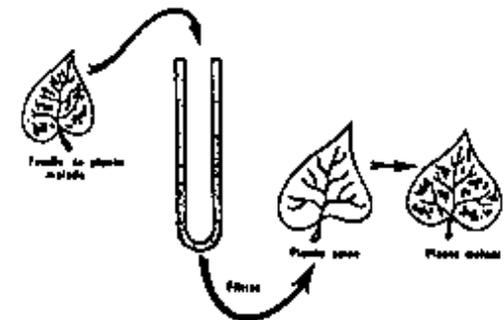
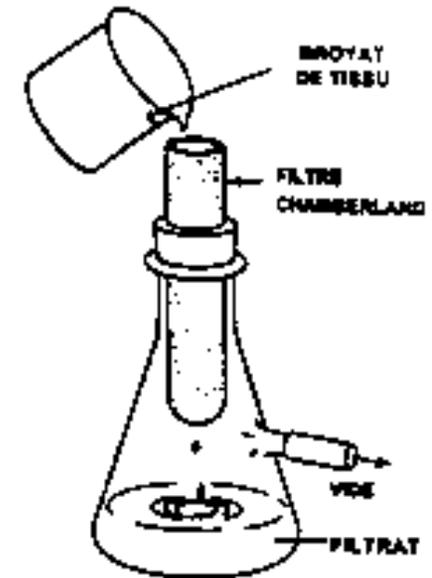
**1885 : L. PASTEUR** réussit à vacciner efficacement contre la rage



## **Postulats de Koch (1876) pour la définition d'un agent pathogène :**

- 1. Le microorganisme suspect doit être présent dans chaque cas de maladie, mais absent des organismes sains (**association agent/ syndrome**)**
- 2. Le microorganisme suspect doit pouvoir être isolé et cultivé en culture pure à partir d'un hôte malade (**isolement**)**
- 3. L'organisme doit pouvoir être ré-inoculé à un hôte sain et entraîner l'apparition de symptômes identiques à ceux observés sur l'hôte de départ (**reproductibilité**)**
- 4. L'organisme doit pouvoir être ré-isolé de l'hôte contaminé, mis en culture pure, et être identique à l'organisme initialement isolé (**réisolement**).**

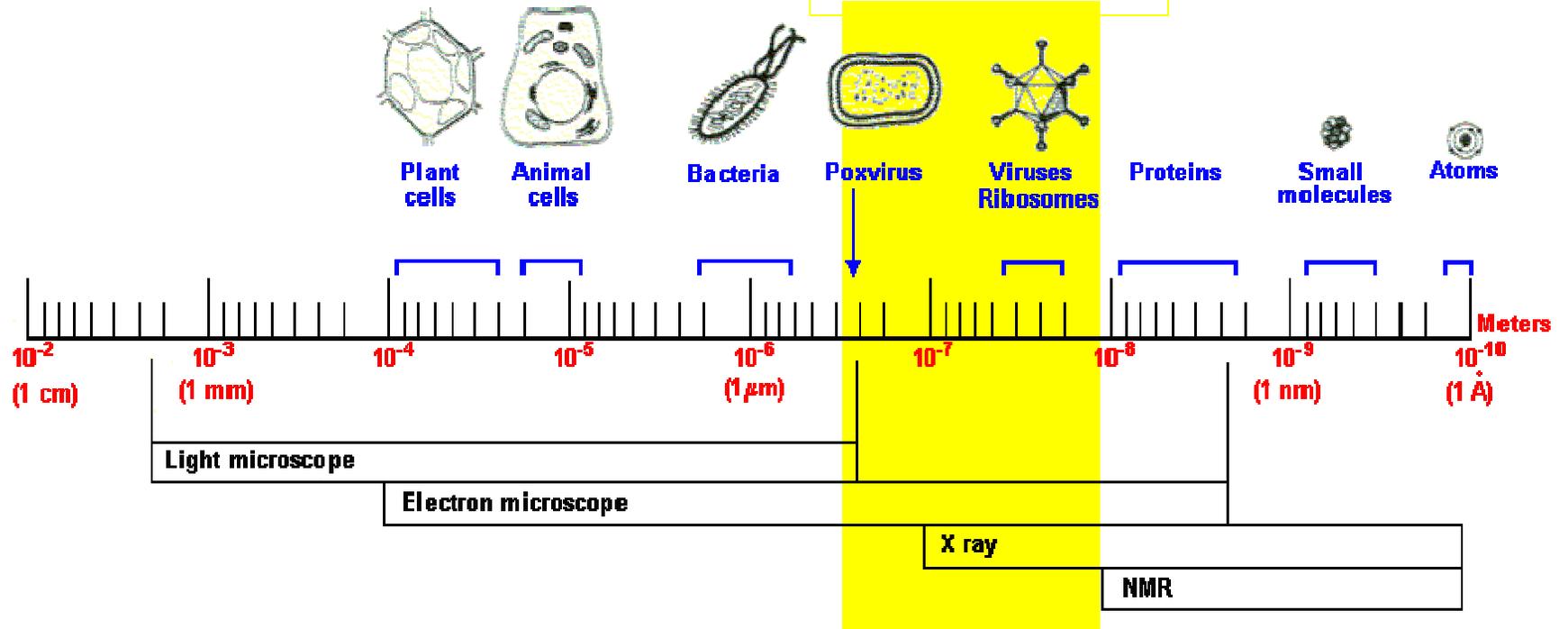
	<p><b>Agents ultrafiltrables</b></p>
1884	<p><i>Charles Chamberland</i> met au point la bougie du même nom (filtre de porcelaine). L'idée que certains agents pathogènes peuvent passer à travers commence à apparaître : virus filtrables (<i>Sédillot</i>), infrabactéries (<i>Pasteur</i> à propos de la rage).</p>
1892	<p><i>Dimitri Ivanowsky</i> observe que la maladie de la mosaïque du tabac est transmise par des agents non retenus par filtration → Notion d'agents ultrafiltrables. Mais il pense qu'il s'agit d'une toxine bactérienne.</p>
1898	<p><i>Martinus Beijerinck</i> fait la même observation puis démontre que l'agent est transmissible d'une plante à une autre sur plusieurs générations → l'agent se multiplie → ce n'est pas une toxine → fluide contagieux. <b>Le premier virus identifié est un virus de plante : le virus de la mosaïque du tabac (MTV).</b></p>
1899	<p><i>Friedrich Loeffler</i> et <i>Paul Frosch</i> découvrent le <b>premier virus animal : le virus de la fièvre aphteuse des bovins.</b>  <b>Ces nouveaux agents sont appelés « agents ultrafiltrables » puis tout simplement virus. La virologie est née. → La première définition des virus se fait en termes négatifs : ils sont non filtrables, non visibles, non cultivables.</b></p>
1901	<p><i>Walter Reed</i> identifie le premier virus humain : le virus de la fièvre jaune.</p>
1908	<p><i>Vilhelm Ellerman</i> et <i>Olaf Bang</i> identifient un virus responsable de leucémies chez le poulet → <b>premier virus oncogène.</b></p>
1911	<p><i>Peyton Rous</i> identifie un virus responsable de tumeurs solides chez le poulet (RSV pour <i>Rous sarcoma virus</i>).</p>
1915-17	<p><i>Frederick Twort</i> et <i>Felix d'Hérelle</i> découvrent indépendamment les bactériophages.</p>



## Règles de **Koch** modifiées par **Bos**

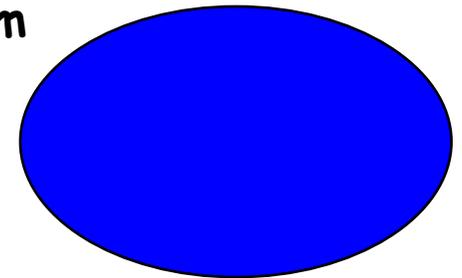
- Le virus doit être isolé d'un individu malade
- Il doit être multiplié en cellules hôtes
- Il doit être filtrable
- Il doit produire une maladie comparable chez un hôte voisin
- Il doit être isolé des hôtes infectés par la souche cultivée
- Une réponse immunitaire spécifique du virus doit être détectée

# Les VIRUS



Diamètre/ longueur x largeur en nm

<i>E. coli</i>	4000 x 1300	
Rickettsias, Chlamydia (bactéries endophytes)	475	
Poxvirus	450 x 230	
Bactériophage T4	95 x 65 (tête)	
Virus de la grippe	85	
Virus de la mosaïque du tabac	300 x 18	
Poliovirus	25	
Nanovirus	17	



## Développements technologiques permettant l'étude des virus et de leur cycle infectieux (I)

i) la culture cellulaire *in vitro*

=> **production des virus des animaux**

ii) l'ultracentrifugation

=> **purification des virus**

iii) la microscopie électronique

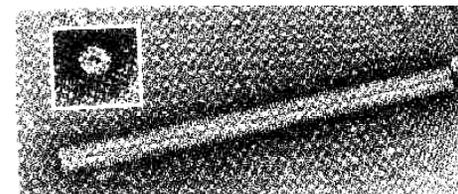
=> **détermination de la forme, la taille et l'architecture des virus**

en 1939, G. KAUSCHE et H. RUSKA ont pu visualiser au microscope électronique la forme en bâtonnet du VMT

iv) la diffraction aux rayons X

=> **détermination de la structure tridimensionnelle des particules virales**

la première analyse par diffraction des rayons X des cristaux de VMT a été réalisée en 1941 par J. BERNAL et I. FANKUCHEN



## **Développements technologiques permettant l'étude des virus et de leur cycle infectieux (II)**

**v) la biologie moléculaire et le génie génétique 1980 - ...**

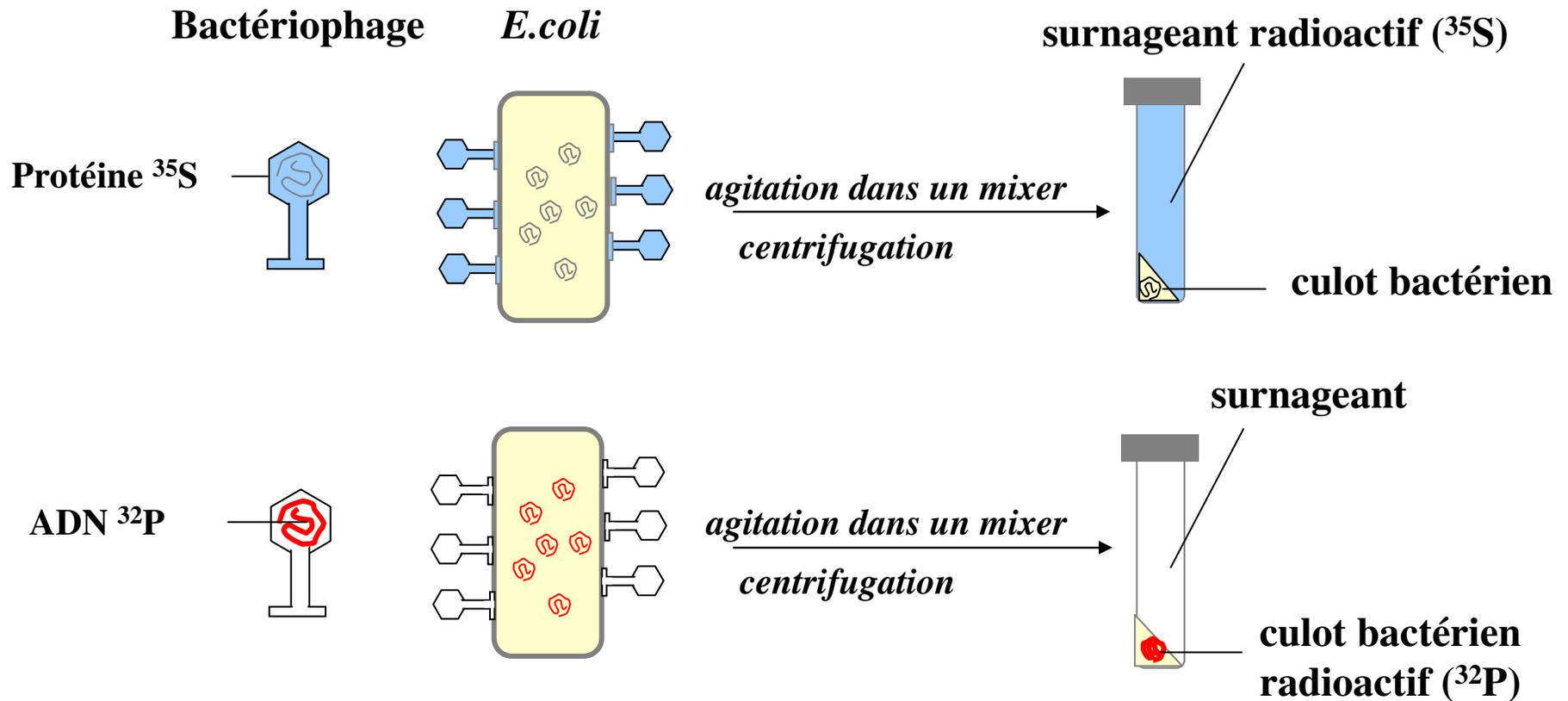
**=> détermination de la structure primaire des génomes viraux et par déduction, celle des protéines**

**=> compréhension des mécanismes impliqués dans l'expression et la réplication du génome viral**

**vi) la génétique inverse qui permet de convertir l'ARN en ADN grâce à la transcriptase inverse, une ADN polymérase-ARN/ADN dépendante (enzyme des rétrovirus), a tout particulièrement permis de faire des progrès considérables dans l'étude des virus à ARN**

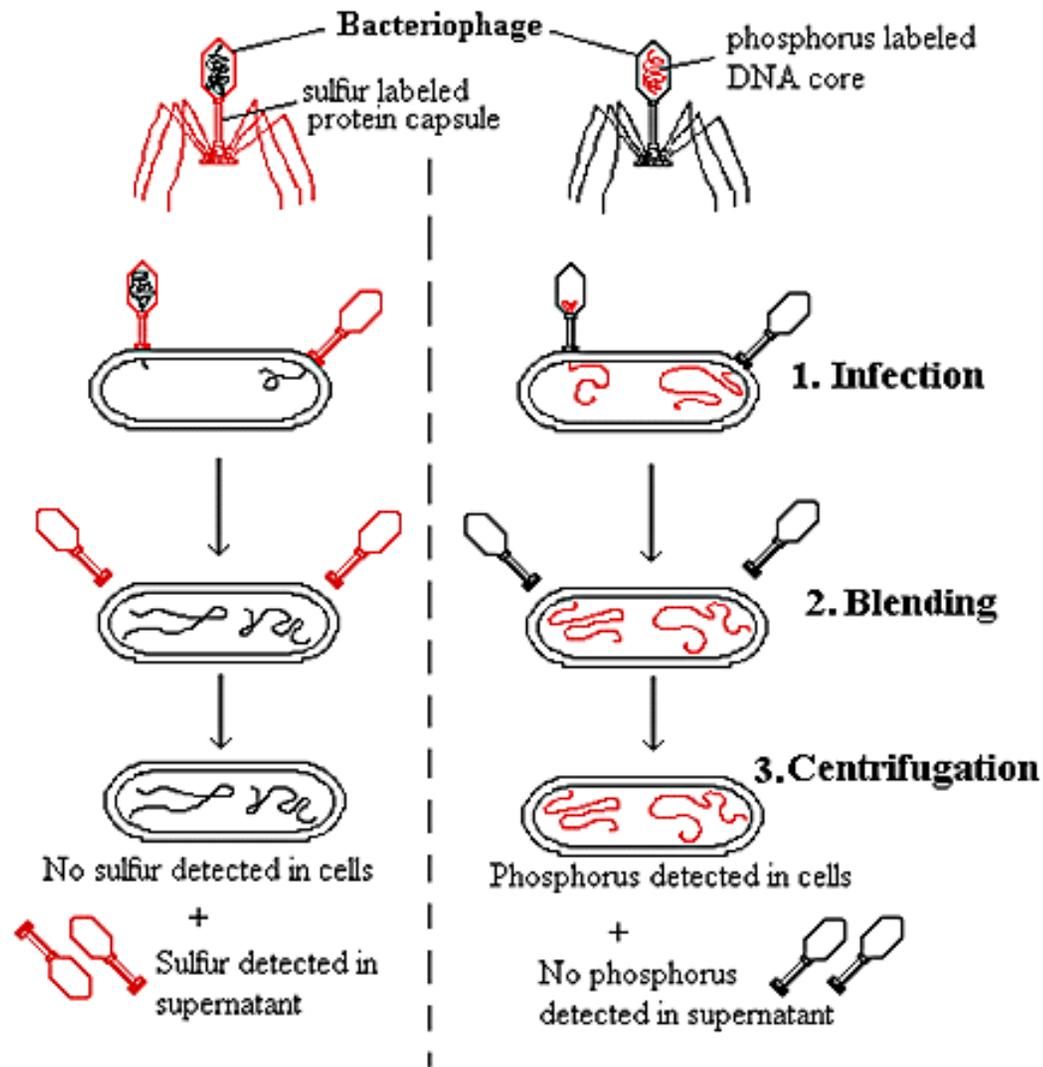
**vii) Les virus sont également utilisés en thérapie génique, comme matériaux de base en nanotechnologies, ...**

*Expérience de A.HERSHEY et M. CHASE (1952)*



**l'ADN du bactériophage porte toute l'information nécessaire pour la synthèse de nouveaux virions**

**Fraenkel-Conrat & Singer /GIERER et SCHRAMM montrent en 1956 que l'ARN du VMT est suffisant pour diriger la synthèse de virions**



## The Hershey-Chase Experiment

# Sommaire

**1. Définitions**

**2. Architecture**

**3. Taxonomie**

**4. Multiplication**

# Définitions

André LWOFF (1953)

1. le virus est une **entité nucléoprotéique** renfermant **qu'un seul type d'acide nucléique**, de l'ADN ou de l'ARN : cet acide nucléique constitue le génome viral
2. le virus se **reproduit uniquement à partir de son acide nucléique**
3. le virus est incapable de croître en taille et en volume et de subir des divisions binaires pour se multiplier. Il se multiplie dans la cellule uniquement par synthèse et assemblage de ses constituants
4. le virus ne renferme aucune information génétique spécifique des enzymes impliquées dans la production d'énergie. Il ne peut pas développer par lui-même l'énergie nécessaire pour la synthèse de ses constituants
5. le virus ne se multiplie qu'à l'intérieur des cellules vivantes. Il est incapable de se développer sur un milieu inerte même si on lui fournit des éléments nutritifs. Il est entièrement dépendant pour sa multiplication, des structures de la cellule hôte qu'il infecte. Ce point définit le virus comme étant un **parasite intracellulaire obligatoire**

## Définition moderne des virus

**Les virus sont des entités nucléoprotéiques possédant un seul type d'acide nucléique\*, parasite intracellulaire obligatoire, infectieuses de façon autonome, incapable de croître et de subir des divisions binaires, ne codant pour aucune fonction du métabolisme intermédiaire.**

\* : à nuancer (certains virus rétroïdes, mimivirus, CMV)

Cette définition exclut les organites (mitochondries, chloroplastes) et les éléments génétiques mobiles (rétrotransposons, transposons) qui sont non infectieux, les éléments sub-génétiques (plasmides, épisomes) non autonomes dans les conditions naturelles, et les prions (dépourvus d'acides nucléiques *a priori*). Les agents sub-viraux sont : les viroïdes (ARN nu circulaire non codant), les agents satellites (= « parasites » de virus i.e. non autonome – ce sont des « acides nucléiques satellites » ou des « virus satellites » s'ils codent leur propre capsid) et les prions.

Distinction entre les termes « virus » et « virion » : le terme « virus » désigne aussi bien les formes extra- et intra-cellulaires de ces entités alors que le terme « virion » désigne uniquement la forme extracellulaire qui est la forme infectieuse mais métaboliquement (quasi) inactive.

## Les virus, des entités à la frontière du vivant

**Classiquement, la définition du vivant repose sur la cellule :**  
une membrane plasmique autour d'un génome transmissible à la descendance ayant une certaine autonomie métabolique (au moins un système de traduction et des voies ana- et cata-boliques) avec une capacité d'évolution et une durée de vie limitée.

Les virus possèdent des propriétés des organismes vivants (génome, adaptation) mais sont incapables de capter et stocker de l'énergie, et sont ainsi fonctionnellement inactifs hors de la cellule.

Les virus sont-ils des microbes ou des molécules ? En un mot, sont-ils vivants ?

Réponse :

" Les virus sont... des virus " (André Lwoff - Prix Nobel en 1970)

**Proposition d'une nouvelle définition qui pourrait inclure les virus ?**

« Un organisme vivant est une entité élémentaire d'un lignage continu (critère de multiplication) avec une histoire évolutive individuelle (critère d'évolution) ».

# Origine des virus: 3 scenarii

**Scénario n°1.** Les virus sont apparus avant "l'invention" des cellules

Hypothèse peu probable, car si les virus avaient été autrefois "vivants", ils auraient eu du matériel répliatif. Et il est difficile d'envisager que ce matériel ait été assez stable... avant l'invention de la cellule."

**Scénario n°2.** Ils sont apparus en même temps

Dans cette perspective, les virus seraient apparus simultanément des molécules les plus primitives qui, les premières, réussirent à se reproduire. Quelques-unes de ces molécules auraient fini par constituer des unités d'organisation et de duplication appelées cellules, tandis que d'autres se seraient assemblées pour former les particules virales, qui en évoluant de façon parallèle aux cellules, en seraient devenues des parasites.

**Scénario n°3.** Ils sont apparus après

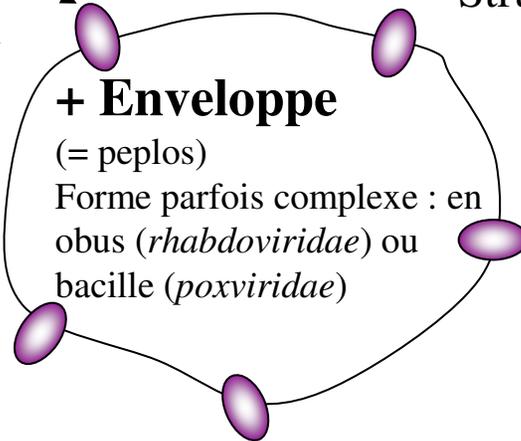
Aujourd'hui, tous types de cellules peuvent être infectés. Ce qui laisse penser que les virus sont apparus après les premières cellules. Comment ? Une cellule a pu en infecter une autre, puis perdre sa capacité à être autonome. C'est ce que suggèrent les rickettsies. Cette théorie voit également dans les virus les plus complexes (comme les herpès) le résultat d'une régression, celle de petites cellules procaryotes ayant parasitées de plus grosses puis s'étant simplifiées à l'extrême et étant devenues plus dépendantes de leur hôte. Les virus seraient donc une forme parasitaire qui aurait connu une évolution simplificatrice.

Une autre hypothèse appréhende les virus comme des morceaux d'ADN ou d'ARN devenus indépendants et capables de sortir d'une cellule et de mener une vie parasitaire.

Spicules = projections de surface  
= boutons = antirécepteur viral

# Composants des virus

Structure métastable



## + Enveloppe

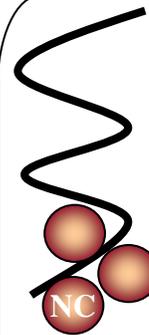
(= peplos)  
Forme parfois complexe : en  
obus (*rhabdoviridae*) ou  
bacille (*poxviridae*)

## +/- tégument

(= matrice, protéines MA -  
cohésion)

## Nucléocapside (= structure finale des virus nus)

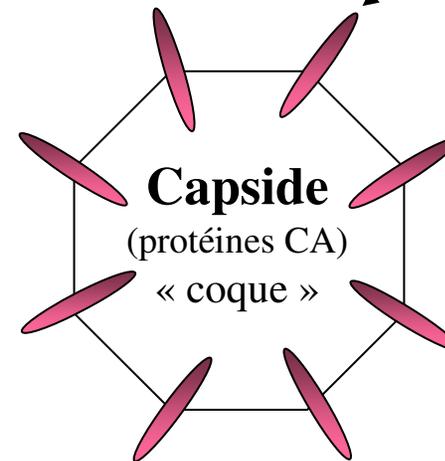
Plusieurs nucléocapsides  
pour certains génomes  
fragmentés (ex :  
*orthomyxovirus*)  
Ches les *reovirus*, capsid  
supplémentaire pour  
entourer l'ensemble des  
petites capsides



## Acide nucléique (ADN ou ARN)

Simple ou double brin (parfois les deux :  
*hepdnaviridae*)  
Fragmenté ou non  
Linéaire ou circulaire  
Parfois associé à des nucléoprotéines basiques  
(NC) pour le stabiliser et former le core ou  
nucléoïde

+



## Capside

(protéines CA)  
« coque »

Spicules des  
virus nus

Hélicoïdale  
Icosaédrique  
Mixte ou complexe  
Parfois en plusieurs couches  
(ex : 3 *rotavirus*)

+/- autres molécules : nucléiques (ex : ARNt) ou  
protéiques (ex : réplicases)

structure  
finale des  
virus  
enveloppés

# VIROIDES, VIRUS DE L'HEPATITE D ET PRION

On a décrit des agents infectieux encore plus simples que les virus :

## - les viroïdes (1978)

Les viroïdes se composent d'un acide nucléique seul. Ce sont de simples boucles d'ARN d'environ 300 nucléotides qui se répliquent mais ne codent aucune protéine. Leur présence perturberait la maturation des ARN messagers cellulaires. Les viroïdes n'ont été observés jusqu'à présent que dans le monde végétal (pomme de terre, tomate...).

## - le virus de l'hépatite D (1977)

Le virus de l'hépatite D est le seul membre connu des Deltavirus. Le génome est un ARN circulaire codant une seule protéine de capsid (l'antigène delta). C'est le plus petit virus connu parasitant l'homme : incapable de se multiplier seul, il se manifeste toujours associé au virus de l'hépatite B, dont il emprunte l'enveloppe pour entourer sa nucléocapside. Un virus incapable de se multiplier seul est un virus dit « défectif » .

## - les prions (1982) (prion est un anagramme de prion : proteinaceous infectious particle)

Les prions sont la cause d'encéphalopathies spongiformes :

la maladie des vaches folles,

la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme.

Comme l'agent infectieux résiste aux nucléases, aux UV, à l'ébullition, on peut penser qu'il est dépourvu d'acide nucléique.

C'est encore à l'heure actuelle une énigme biologique.

Les prions seraient des protéines sans acide nucléique associé, protéines caractérisées par une résistance exceptionnelle à l'action des protéases.

Cette protéine (la PrPres : protéine du prion résistante aux protéases) est proche d'une protéine normalement trouvée dans le système nerveux (la PrPc : protéine du prion cellulaire).

En sa présence, la protéine normale subirait une simple modification de sa conformation qui la transforme en protéine anormale. Celle-ci devient à son tour résistante à l'action des protéases : elle s'accumule dans les lysosomes qui éclatent. Les enzymes lysosomiales endommagent les neurones, créant des trous : le cerveau ressemble à une éponge.

# Les éléments mobiles

17% du génome de *Arabidopsis thaliana*

18% du génome de *Drosophila melanogaster*

42% du génome de *Homo sapiens*

plus de 50% du génome de *Zea maïs*

**les transposons** à ADN, dits aussi « bactériens », bordés de séquences inversées répétées appelées IR; exemples: Tn, Tc1, élément P, Ac/Ds

**les rétrotransposons** de classe I qui transposent par l'intermédiaire d'un ARN; ils sont bordés de deux "long terminal repeats" appelées LTR, en répétition directe; exemples: Ty, copia, IAP (intracisternal-A particle);

Il existe des formes dérivées des rétroéléments comme les éléments Line et Sine qu'on nomme rétrotransposons de classe II.

Les rétrovirus ne font pas partie des transposons puisqu'ils ont une forme infectieuse.