

A- QCM en ligne

B- RÉTROVIRUS ET CANCER

Sur papier libre, vous répondrez aux questions posées ci-dessous (4 pages maximum).

Rappel : toute réponse doit être argumentée.

Les rétrovirus forment une classe de virus dont le génome est constitué d'un ARN simple brin et qui infectent des cellules eucaryotes. Ce génome est contenu dans une capsid, en compagnie d'une molécule de transcriptase inverse. Lorsqu'une particule virale a fait pénétrer son génome dans une cellule, la transcriptase inverse recopie cette information sous la forme d'un ADN double brin (ADN proviral). L'ADN proviral entre dans le noyau puis s'intègre au hasard dans l'un des chromosomes de la cellule infectée. Parfois, il arrive que l'insertion de l'ADN proviral provoque la « transformation tumorale » de la cellule, c'est-à-dire qu'elle rend la cellule cancéreuse en provoquant sa multiplication incontrôlée.

1 – A partir d'une cellule infectée, on purifie l'ADN proviral avant intégration. On le soumet à plusieurs endonucléases de restriction et on sépare les produits de digestion par électrophorèse dans un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. L'observation du gel aux rayons ultra-violet permet de comparer la migration de chaque fragment avec celles de fragments de tailles connues et d'en déterminer la taille. Les résultats obtenus (en paires de bases) sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

BamHI	BglI	PstI	BamHI+BglI	BamHI+PstI	BglI+PstI
8970	4930	6880	4040	3920	4450
	4040	2090	3440	2960	2430
			1490	2090	1610
					480

a- La molécule d'ADN viral proviral avant intégration est-elle linéaire ou circulaire ? Justifiez votre réponse.

b- Déterminez la carte de restriction du génome viral avant intégration en précisant les principales étapes de votre raisonnement.

2 – Les chromosomes de la cellule infectée étant linéaires, on précise que dans le cas où l'ADN proviral est circulaire il doit être coupé une fois (« linéarisé ») et s'intégrer dans le chromosome après coupure de celui-ci également. Pour connaître la structure du génome viral à l'état intégré, on purifie l'ADN chromosomique (CT) de la cellule transformée et on le soumet à une digestion par chacune des trois endonucléases de restriction utilisées précédemment. Les fragments de digestion sont séparés par électrophorèse. Après quoi, les fragments d'ADN chromosomique sont transférés sur une membrane de nylon puis mis en présence du fragment d'ADN du virus préalablement marqué radioactivement au P^{32} sur toute sa longueur. L'ensemble est soumis à une dénaturation par la chaleur puis ramené progressivement à température ambiante. Enfin, les bandes d'ADN chromosomique capables de s'hybrider à tout ou partie du matériel radioactif sont révélées par autoradiographie (technique dite du *Southern Blot*). Elles ont les tailles suivantes (en paires de bases) :

BamH I		Bgl I		Pst I	
V	CT	V	CT	V	CT
8970	14730	4930	10130	6880	14210
	13250	4040	4040	2090	7920
			3400		6880

V = ADN du virus seul (témoins) ; CT = ADN génomique de la cellule transformée

b- Indiquer dans quelle partie de l'ADN proviral a dû avoir lieu la coupure nécessaire pour l'intégration dans le génome cellulaire.

10 20 50 60

5'-GGTCAATCTATCAA.....TAGGCTATAAATCAAT-3'

b- Comme le virus transcrit fortement son propre génome après intégration, quelle pourrait-être la conséquence de cette intégration pour la cellule ? Proposer en conséquence un mécanisme qui pourrait expliquer la transformation tumorale de la cellule dans ce cas.

4 – BONUS : Proposer une méthode permettant d'identifier précisément (au nucléotide près) le site auquel s'est inséré le virus dans le chromosome de la cellule transformée.

On fera l'hypothèse qu'on ne peut pas séquencer directement l'ADN génomique avec une amorce spécifique du virus, par manque d'ADN matrice [NB: il n'y a qu'une copie du virus par ADN cellulaire, donc il faudrait une centaine de milliards de cellules (!) pour avoir assez de molécules d'ADN à séquencer, cf DAM2].