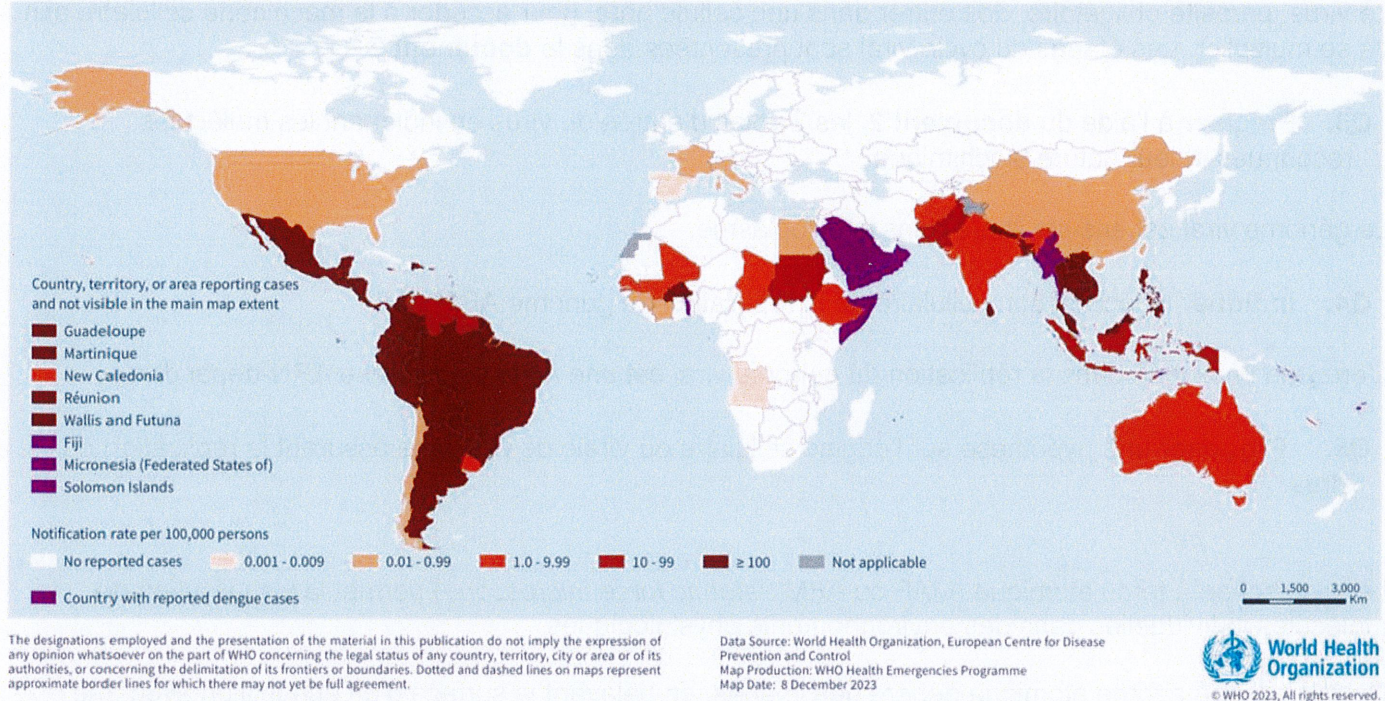


La lutte contre le virus de la dengue Un défi stratégique à l'heure du réchauffement climatique

La dengue, également connue sous le nom de « grippe tropicale », est aujourd'hui perçue comme une maladie ré-émergente. Plusieurs éléments contribuent à la multiplication des moustiques vecteurs du virus de la dengue, ce qui entraîne une augmentation de sa transmission à l'être humain.

En 2024, plus de 12,5 millions de cas et 10 000 décès liés à la dengue ont été déclarés, une hausse qui dépasse les 6,5 millions de cas recensés antérieurement en 2023 et confirme une progression sans précédent de la maladie. Cette recrudescence des cas de dengue est mondiale, avec plus de 80 pays/territoires touchés, dont la France.

Pays/territoires/zones signalant des cas de dengue autochtone (novembre 2022 — novembre 2023)



Source : <https://www.who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>

Des groupes de cas de dengue autochtone ont par ailleurs été signalés en Europe.

L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a estimé que le risque était élevé à l'échelle mondiale, compte tenu du risque accru de transmission et de la recrudescence des cas et des décès.

Plusieurs facteurs sont associés au risque croissant de propagation de l'épidémie de dengue, parmi lesquels l'évolution de la répartition des vecteurs (principalement les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*) : les conséquences du changement climatique entraînant une hausse des températures, de l'humidité, et de fortes précipitations, [...]. ; des systèmes de santé fragilisés, dus à des instabilités politiques et financières dans des pays confrontés à des crises humanitaires complexes et de forts mouvements de population.

De nombreuses recherches se concentrent actuellement sur une meilleure connaissance de ce virus émergent ainsi que des moyens innovants de diagnostic biologique et lutte.

Le virus de la dengue DENV est un virus enveloppé à ARN+ c'est à dire que l'ARN viral correspond à un ARN qui peut être traduit directement par les ribosomes cellulaires, de la même manière qu'un ARNm (messager). Le **document 1** présente la structure du virus DENV.

Q1. Citer les bases azotées présentes dans les molécules d'ARN.

Q2. Expliquer, par analogie avec la structure de la double hélice d'ADN, comment peut se former la structure d'ARN bicaténaire intervenant dans les boucles SLA et SLB, visualisées dans le **document 1**.

Le virus, parasite obligatoire, doit entrer dans une cellule hôte, pour accéder à la machinerie cellulaire afin de se multiplier. Les étapes du cycle viral sont présentées dans le **document 2**.

Q3. Préciser à l'aide du **document 2**, les 2 voies d'entrée du virus en indiquant les molécules reconnues et leur nature biochimique.

Le génome viral est ensuite libéré dans le cytoplasme.

Q4. Indiquer la localisation cellulaire de la réplication du génome ARN viral.

L'enzyme impliquée dans la réplication du génome viral est une ARN polymérase ARN-dépendante.

Q5. Proposer une hypothèse sur l'origine cellulaire ou virale de l'enzyme assurant la réplication du virus.

Le microscope à force atomique (MAF ou AFM : *atomic force microscope*) permet la visualisation de molécules individuelles dans des environnements physiologiques.

Un microscope à force atomique génère des images, en balayant la surface d'un échantillon avec une pointe nommée *cantilever*. La pointe à l'extrémité du *cantilever* entre en contact avec la surface, ce qui plie le *cantilever* et modifie la quantité de lumière laser réfléchie dans la photodiode. (**Document 3**).

Une expérience de visualisation du génome ARN des virus de la dengue a été réalisée par cette technologie AFM couplée à la luciférase (**Document 4**). Une image agrandie (512 pixels par 512 pixels) a été obtenue (**Document 4B**). Chaque pixel de cette image agrandie mesure 100 µm de large.

Q6. Calculer le grossissement de l'image par cette technologie AFM, sachant que le grossissement est la taille de l'image observée divisée par la taille réelle de l'image. En **déduire** un des intérêts de cette technologie.

Q7. Calculer le temps d'acquisition de l'observation présentée sur l'agrandissement du document 4B, sachant que la vitesse de balayage est de 1 ligne par seconde, avec une taille de ligne de balayage de 0,5 µm. En **déduire** une des limites de cette technologie.

Q8. Analyser les résultats obtenus par AFM (**Document 4**).

Q9. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer l'intervention des extrémités 5' UTR et 3'UTR dans la circularisation de l'ARN viral.

Différentes manipulations ont été réalisées afin de préciser la fonction des extrémités 5' UTR et 3'UTR dans le mécanisme infectieux du virus, en particulier dans sa réplication (**Document 5**).

Des mutations ponctuelles ont été réalisées au niveau des extrémités 5' UTR et 3'UTR du génome viral (**Documents 5B et 5C**) et les séquences mutantes (mut) ou sauvages (wt) ont été associées pour la réalisation d'expériences d'électrophorèse et d'expression protéique (**Documents 5D, 5E et 5F**).

- Q10. Schématiser** à l'aide des séquences du **document 5C**, le complexe ARN-ARN formé par la sonde 3'SL WT avec la matrice ARN 5'UTR-C62 WT.
- Q11. Analyser** les résultats obtenus lors de l'hybridation de l'ARN 5'UTR-C62 WT avec la sonde 3'SL WT (**Document 5D et 5E**).
- Q12. Analyser** les résultats obtenus lors de l'hybridation de l'ARN 5'UTR-C62 MUT 175 avec la sonde 3'SL WT (**Document 5D et 5E**).
- Q13. Analyser** les résultats obtenus lors de l'hybridation de l'ARN 5'UTR-C62 MUT 175 avec la sonde 3'SL mutée 177 (**Document 5D et 5E**).

L'expression des protéines virales nécessite la circularisation de l'ARN viral (**Document 5F**).

- Q14. Expliquer** la présence au jour 3 d'une fluorescence verte dans les cellules dans lesquelles l'ARN viral sauvage a été introduit (**Document 5F**). **Préciser** le rôle de cette expérience.
- Q15. Expliquer** l'absence de fluorescence verte dans les deux conditions expérimentales avec les ARN viraux simplement mutés MUT 175 ou MUT 177.
- Q16. Expliquer** la présence de fluorescence verte dans la condition expérimentale avec l'ARN viral doublement muté MUT 175 et MUT 177.
- Q17. Montrer** que les résultats de production de protéines virales par les différents mutants sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'électrophorèse des complexes matrice-sonde (**Documents 5E et 5F**) et ceux du microscope à force atomique.

La dengue est transmise par le DENV (virus de la dengue) après piquûre d'un moustique femelle *Aedes* lui-même infecté après piquûre d'une personne atteinte en phase virémique (virus circulant dans le sang). Les arbovirus, groupe de virus comprenant le virus de la dengue, ont d'abord été caractérisés comme des virus zoonotiques, ce qui signifie qu'ils ont un réservoir animal (chevaux, oiseaux, rongeurs...) et impliquent uniquement le moustique vecteur et l'animal (**Document 6**).

Q18. Expliquer, à l'aide du **document 6**, comment l'infection est arrivée en milieu urbain.

Les symptômes de l'infection par le DENV comprennent l'apparition soudaine de fièvre, de douleurs corporelles, de maux de tête, de douleurs articulaires, d'éruptions cutanées et de douleurs rétro-orbitaires. Bien que généralement bénigne ou asymptomatique, l'infection par le DENV peut évoluer vers des formes graves et potentiellement mortelles, de type fièvre hémorragique. Elle peut provoquer des lésions hépatiques et augmenter la perméabilité vasculaire, une thrombocytopénie (diminution du nombre de plaquettes sanguines) et entraîner des manifestations hémorragiques. Le syndrome de choc de la dengue, la forme la plus grave de la dengue hémorragique, se caractérise par un pouls faible et une chute soudaine de la tension artérielle qui est le résultat de l'effondrement du système vasculaire sous l'effet de la maladie.

Les premières cellules atteintes par l'infection sont les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans et les macrophages entraînant une réponse inflammatoire locale (**Documents 7 et 8**).

Les mécanismes immunitaires qui contribuent à limiter la réplication virale et à atténuer les symptômes peuvent dysfonctionner et provoquer une inflammation sévère et prolongée, pouvant conduire à une fièvre hémorragique.

Q19. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer les fuites plasmatiques pouvant entraîner une fièvre hémorragique (**Document 8**).

Q20. Rédiger, à l'aide des **documents 7 et 8**, un court texte décrivant les étapes de la réaction inflammatoire au cours d'une infection virale permettant de lutter contre la maladie en précisant les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués.

L'évolution de la cinétique d'apparition des anticorps au cours d'une infection primaire et d'une infection secondaire par le virus de la dengue est représentée sur le **document 9**.

Q21. Comparer et expliquer les profils obtenus lors des réponses primaire et secondaire.

Le virus de la dengue comporte quatre variants différents ou sérotypes, nommés : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4.

Ainsi, l'infection par l'un de ces variants entraîne la formation de cellules mémoires spécifiques à celui-ci mais n'entraîne pas une immunité aux autres variants puisque les anticorps neutralisants ne sont efficaces que contre le variant homologue. Il est donc possible de contracter quatre fois la dengue, d'autant plus que, lors d'une infection ultérieure dite secondaire, le risque de développer une dengue sévère augmente, par un mécanisme de facilitation immunologique lié aux anticorps appelée ADE (*anti body dependent enhancement of infection*).

Q22. Expliquer, à l'aide du **document 10**, comment, dans le cas d'une infection secondaire par un sérotype différent, le mécanisme responsable de l'ADE provoque la forme grave de la dengue.

Le diagnostic biologique de la dengue fait appel à la détection de son génome, d'antigènes (Ag) viraux ou d'anticorps (Ac), selon le stade précoce ou plus tardif de la maladie.

La détection spécifique de l'Antigène NS1 a ouvert une nouvelle voie dans le diagnostic précoce de la dengue. Cette glycoprotéine est sécrétée par la cellule infectée. Elle est détectable dans le sérum des patients pendant la phase précoce.

La méthode de dépistage qualitatif *in vitro* la plus utilisée pour l'infection par le virus de la dengue est la technique d'immuno-essai à flux latéral. (**Document 11**).

Q23. Argumenter le choix de la détection de la protéine NS1, à l'aide du **document 2**.

Q24. Schématiser, à l'aide du **document 11A**, un édifice moléculaire au niveau de la ligne contrôle et un édifice moléculaire au niveau de la ligne test pour un échantillon positif à la dengue.

Q25. Préciser le(s) rôle(s) de la bande contrôle. **Justifier** la réponse à l'aide du document 11B.

Une étude de stabilité du test a été effectuée. Les tests ont été entreposés à 25°C, 37°C ou 45°C avec moins de 85% d'humidité relative. Des échantillons identifiés comme positifs à la dengue par ELISA ont été testés pour vérifier cette stabilité. Les résultats sont présentés dans le **document 11C**.

Q26. Interpréter les résultats obtenus.

Q27. Donner le principal intérêt de tester la stabilité de ces tests à des températures relativement élevées. **Argumenter** la réponse.

Les tests sérologiques détectant les IgM et les IgG permettent de compléter le test de détection de NS1.

Q28. Argumenter, à l'aide du **document 9**, l'intérêt de déterminer à la fois le taux d'IgM et le taux d'IgG.

Si aucun test détectant l'Ag NS1 seul ou les IgG/IgM seules ne possèdent une sensibilité suffisante pour affirmer ou infirmer à eux seuls le diagnostic de la dengue, leur combinaison permettrait en théorie d'apporter une réponse dans la majorité des cas. La recherche des IgM et IgG a pour objectif d'augmenter la fenêtre diagnostique par une meilleure sensibilité à la phase tardive de la virémie. Un test diagnostic rapide (ou TDR) immunochromatographique (*One Step Dengue NS1 Ag and IgG/IgM Test, SD Bioline*) est aujourd'hui disponible. Celui-ci détecte simultanément l'antigène NS1 (premier test) et les anticorps spécifiques IgM et IgG sur sérum (second test), dans le sérum, le plasma ou le sang total (**Document 12**).

Q29. Donner le numéro du test du **document 12** correspondant au J10 après l'apparition des premiers signes cliniques du **document 9**. **Argumenter** votre réponse.

Q30. Expliquer les raisons pour lesquelles certains tests du **document 12** ont été indiqués comme invalides.

Selon la HAS (Haute Autorité de Santé), « la RT-PCR conventionnelle reste la méthode la plus efficace pour le diagnostic précoce de la dengue dans les laboratoires spécialisés » (**Document 13**). Cependant, la plupart des tests RT-PCR doivent être effectués dans des laboratoires avec des installations spécialisées. De plus, malgré leur efficacité établie, les méthodes de détection basées sur la RT-PCR présentent un temps de détection long, une instrumentation sophistiquée et une consommation d'énergie élevée.

La PPT-RTcPCR colorimétrique plasmonique est une nouvelle méthode de détection d'acide nucléique du DENV, simple, à plus faible consommation d'énergie, sensible et avec une lecture rapide et à faible coût actuellement en cours de développement, ce qui peut être important dans les zones à ressources limitées.

Les ARN viraux extraits d'échantillons de plasma de patients suspectés d'infection par la dengue ont été soumis à une réaction PPT-RTcPCR spécifique (**Document 14 A**). Le protocole de la PPT-RTcPCR basée sur l'amplification du gène codant pour la protéine d'enveloppe E est présenté dans le **Document 14 B**.

Dans ce système, des nanoparticules magnétiques plasmoniques (PMN) ont été utilisées comme éléments chauffants. La conversion de la lumière en chaleur par les nanomatériaux plasmoniques, connue sous le nom d'effet photothermique plasmonique (PPT), peut être utilisée comme source de chaleur.

Q31. Rappeler les différentes étapes d'une PCR classique, en précisant à chaque fois les paramètres de température.

Q32. Analyser le document 15E pour montrer l'intérêt de l'utilisation des PMN dans le cadre de cette PCR.

Q33. Comparer les documents 15G et 16 pour en déduire l'un des avantages de la PPT RTcPCR.

Parmi les stratégies de lutte contre le virus de la dengue, la lutte anti-vectorielle (lutte contre les moustiques vecteurs) ainsi que l'élaboration de vaccins font l'objet de recherches poussées.

Un des moyens proposés est de modifier génétiquement les moustiques, afin de transformer les femelles en mâles, une idée en cours de développement par une équipe de recherche française.

Le mâle se nourrit uniquement de nectars sucrés, tandis que la femelle pique pour se nourrir du sang d'un animal, nécessaire pour sa production d'œufs.

Le lâcher dans la nature de moustiques génétiquement modifiés pourrait ainsi contribuer à réduire les maladies transmises par ces insectes.

Q34. Présenter l'intérêt d'avoir plus de moustiques mâles dans l'environnement.

Le **document 17** présente les récents travaux de l'équipe française travaillant sur le changement de sexe du moustique par transgénèse.

Q35. Comparer les images a et b (**Document 17**) et **décrire** le phénotype mâle et le phénotype femelle.

Q36. Analyser les résultats c et d (**Document 17**) pour préciser le gène qui est invalidé et les conséquences pour le moustique adulte. En déduire une stratégie pour transformer les femelles moustiques en mâles.

Q37. Émettre une hypothèse sur le type de moustique à utiliser pour enrayer la propagation de la dengue.

Q38. Discuter d'un inconvénient éventuel de l'introduction d'un tel moustique dans l'environnement.

Un deuxième moyen de lutte contre la dengue consiste à l'élaboration d'un vaccin.

Le vaccin Dengvaxia® a obtenu le 12 décembre 2018 une Autorisation de Mise sur le Marché européenne restreinte aux personnes âgées de 9 à 45 ans ayant un antécédent d'infection par le virus de la dengue confirmé biologiquement, ce qui limite considérablement son utilisation. De nouvelles stratégies vaccinales sont à l'étude.

Les vaccins à ARNm sont les plus prometteurs (**Document 18**). Ils présentent plusieurs avantages, notamment, l'expression d'antigènes spécifiques et l'induction directe d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire.

Q39. Relever, dans le **document 18**, les intérêts de l'utilisation des ARN modifiés pour la fabrication des vaccins à ARNm.

L'avantage, également, est que la production de ces ARNm vaccinaux est basée sur un système sans cellule. Ainsi les purifications de l'ARNm en sont facilitées.

La structure de l'ARNm vaccinal présente les mêmes caractéristiques que l'ARNm cellulaire, c'est-à-dire, une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'.

Q40. Expliquer l'intérêt d'une coiffe et d'une queue polyA dans la construction des ARNm vaccinaux (**Document 18**).

Deux ARNm vaccinaux sont disponibles, les ARNm non réplicatifs (NRM) et les ARNm réplicatifs (SAM).

Q41. Indiquer les différences entre ces 2 types de molécules NRM et SAM (**Document 19**).

Q42. Argumenter les avantages d'utiliser un vaccin à ARNm réplcatif (**Document 19**).

Une des premières étapes dans la fabrication de l'ARNm vaccinal est la conception et la production de l'ADN matrice. Une fois l'ARNm produit, celui-ci doit être purifié en plusieurs étapes. L'une d'elle est détaillée dans le **Document 20**. Ce document présente les caractéristiques de la colonne chromatographique utilisée et un exemple de profil chromatographique obtenu lors d'une purification d'un vaccin à ARNm.

Q43. Expliquer le principe de la chromatographie d'affinité d'après le **document 20A**.

Q44. Émettre une hypothèse sur la nature du ligand utilisé et fixé sur les billes du gel chromatographique permettant de purifier l'ARNm.

Q45. Justifier le choix de présenter l'absorbance à 260 nm en fonction du temps sur le profil de chromatogramme représenté sur le **document 20B**.

Q46. Indiquer à quoi correspondent les différents pics du profil chromatographique du **document 20B**.
Justifier.

Pour faciliter la délivrance de l'ARNm vaccinal dans l'organisme hôte, celui-ci est encapsulé dans une nanoparticule lipidique. Le **document 21** montre la structure d'une nanoparticule lipidique encapsulant l'ARNm (liposome).

Q47. Indiquer la principale propriété physico-chimique de la molécule de phospholipide permettant l'organisation en liposome.

Q48. Expliquer l'agencement des phospholipides autour de la molécule et la formation de la vésicule de liposome, sachant que la molécule d'ARNm est hydrophile.

Q49. Présenter les intérêts d'encapsuler les molécules d'ARNm dans cette nanoparticule lipidique.

Synthèse (<i>temps conseillé : 15 min</i>)

Montrer l'intérêt des biotechnologies, pour le diagnostic et la prévention des virus émergents. Les aspects éthique, sociétal et économique sont attendus.

