

Manipulation moléculaire des virus à ARN de polarité négative (ARN⁻) : vers de nouveaux outils en médecine

**Robert Drillien
Paul Howley
Danièle Spehner**

La manipulation moléculaire des virus à ARN de polarité négative a représenté un obstacle majeur à leur étude. Récemment, de nouvelles approches expérimentales ont été élaborées permettant de modifier de façon dirigée plusieurs virus de ces familles et notamment des virus infectieux pour l'homme tels que les virus de la grippe, de la rage et de la rougeole. Quelles que soient les variations dans les méthodes employées, elles tiennent toujours compte de la nécessité de produire les protéines virales de nucléocapside impliquées dans la transcription et la répllication des génomes de ces virus en même temps que l'ARN du génome viral. L'application de ces nouvelles techniques permet d'entrevoir des perspectives intéressantes pour la mise au point de nouveaux vaccins par atténuation dirigée de la virulence et l'élaboration de vecteurs viraux destinés à la vaccination, voire à la thérapie génique.

Au cours des quinze dernières années on a appris progressivement à manipuler le génome d'un certain nombre de virus qui infectent l'homme ou l'animal de façon à leur conférer de nouvelles propriétés. Les virus à ADN de la famille des *Adenoviridae* ou de la famille des *Poxviridae* ainsi que les virus à ARN passant par une phase ADN (*Retroviridae*) font l'objet des études les plus nombreuses, mais la manipulation moléculaire de toutes les autres familles de virus à ADN et de la plupart des virus à ARN de polarité positive est également bien enga-

gée. Certains de ces virus sont d'ores et déjà employés à titre expérimental comme vecteurs de gènes chez l'homme en vue d'une vaccination, d'une immunothérapie ou d'une thérapie visant à suppléer une déficience génétique. Cette panoplie de vecteurs viraux a été développée grâce à la connaissance des stratégies de répllication des virus et à la mise en œuvre de nouvelles techniques. Parmi les données les plus importantes notons : (1) le clonage moléculaire des génomes viraux ; (2) la mise en évidence de séquences virales qui peuvent être interrompues sans destruction du pouvoir répllicatif ; (3)

ADRESSE

R. Drillien : directeur de recherches à l'Inserm. P. Howley : docteur ès sciences, boursier de recherche. D. Spehner : docteur ès sciences, ingénieur d'études Inserm. C.J.F Inserm 94-03, Etablissement de Transfusion Sanguine de Strasbourg, 10, rue Spielmann, 67065 Strasbourg Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Tanaguchi T, Palmieri M, Weissmann C. Q β DNA-containing hybrid plasmids give rise to Q β phage formation in the bacterial host. *Nature* 1978; 274: 2293-8.
2. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981; 214: 916-9.
3. Boyer JC, Haenni L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 1994; 198: 415-26.
4. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995.
5. Enami M, Luytjes W, Krystal M, Palese P. Introduction of site specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3802-5.
6. Enami M, Palese P. High-efficiency formation of influenza virus transfectants. *J Virol* 1991; 65: 2711-3.
7. Muster T, Kanta Subbarao E, Enami M, Murphy BR, Palese P. An influenza A virus containing influenza B virus 5' and 3' non-coding regions on the neuraminidase gene is attenuated in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5177-81.
8. Li S, Polonis V, Isobe H, Zaghouni H, Guinea R, Moran T, Bona C, Palese P. Chimeric influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type I. *J Virol* 1993; 67: 6659-66.
9. Garcia-Sastre A, Muster T, Barclay WS, Percy N, Palese P. Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. *J Virol* 1994; 68: 6254-64.
10. Percy N, Barclay WS, Garcia-Sastre A, Palese P. Expression of a foreign protein by influenza virus. *J Virol* 1994; 68: 4486-92.
11. Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 1994; 13: 4195-203.

l'identification de promoteurs de la transcription; (4) le développement de marqueurs de sélection; (5) la mise au point de méthodes d'introduction de l'acide nucléique par transfection de cellules cibles.

La manipulation moléculaire des virus à ADN passe par le clonage moléculaire d'une partie ou de la totalité du génome viral dans un plasmide bactérien. Une difficulté pour les virus à ARN provient du fait que l'ARN ne peut pas être cloné dans un plasmide. Un premier élément de réponse à cet obstacle a été apporté dès 1978 pour le bactériophage Q β [1] et dès 1981 lors du clonage d'un ADN complémentaire (ADNc) de l'ARN du poliovirus dans le plasmide bactérien pBR 322 [2]. La transfection de ce dernier plasmide dans des cellules de singe et sa transcription par l'ARN polymérase cellulaire engendre un ARN viral complet capable d'engager un cycle viral productif. En effet, l'ARN du poliovirus, de polarité positive (ARN⁺), équivaut à un ARN messenger susceptible d'être traduit en protéines structurales et non structurales nécessaires au déroulement du cycle viral. Une amélioration considérable de cette méthode a consisté à cloner l'ADNc des virus à ARN⁺ en aval d'un promoteur du bactériophage T7 ou SP6 (pour une revue récente voir [3]). L'ADNc cloné est transcrit *in vitro* par l'ARN polymérase du bactériophage T7 ou SP6 en un ARN génomique. Celui-ci peut être transfecté dans des cellules sensibles qui produiront du virus infectieux.

Dans le cas des virus à polarité négative (ARN⁻) une difficulté conceptuelle et technique supplémentaire se présente. Les génomes de ces virus ou encore leurs antigénomes de polarité positive produits lors du cycle viral, ne sont pas infectieux après transfection dans des cellules sensibles. Cette absence de pouvoir infectieux de l'ARN viral tant du brin + que du brin -, peut être expliquée par l'organisation structurale de la particule virale et une stratégie de réplication particulière ([4], *figure 1*). L'ARN de ces virus est associé à plusieurs protéines dans un complexe ribonucléoprotéique appelée nucléocapside. Une protéine majeure de la nucléocapside, la nucléoprotéine (NP ou N selon l'espèce virale),

entoure l'ARN pour former une structure hélicoïdale. Une à trois autres protéines, sont attachées aux nucléocapsides et, grâce à leur activité ARN polymérase dépendante de l'ARN, sont directement responsables de la réplication et de la transcription du génome viral. Ainsi, la nucléocapside constitue l'organisation la plus simple requise pour le démarrage d'un cycle viral. Après pénétration du virus dans la cellule, le cycle débute toujours par la transcription du génome en ARN messagers pour les protéines virales. Cette phase est suivie de la réplication du génome parental de polarité négative en génome de polarité positive. Ce dernier à son tour sert de matrice à la synthèse de génomes de polarité négative destinés à être enveloppés pour former les particules virales mûres. A chacune de ces étapes, l'ARN viral génomique, quelle que soit sa polarité, est engagé dans le complexe nucléoprotéique. Par conséquent, l'ARN génomique débarrassé des protéines de nucléocapside est inerte dans la cellule tandis que l'ARN encapsidé dans une nucléocapside peut être répliqué et transcrit grâce à sa polymérase constitutive. C'est en tenant compte de ces données que plusieurs groupes de recherche ont mis au point des stratégies dont l'objectif est la manipulation du génome des virus à ARN⁻.

Les Orthomyxoviridae

Les premières manipulations génétiques de ces familles de virus ont été réalisées par le groupe de Peter Palese (New York, NT, USA) avec un virus à génome segmenté: le virus de la grippe A. Ce virus enveloppé renferme huit nucléocapsides distinctes qui contiennent chacune d'entre elles un ARN différent. Chaque segment code pour une ou deux protéines, la capacité totale de l'ensemble des segments étant de dix protéines. Le groupe de P. Palese a focalisé ses efforts sur la manipulation moléculaire de certains des segments. L'ADNc de ces segments d'ARN a été placé en aval d'un promoteur du bactériophage T3. L'ARN correspondant, de polarité négative, est produit *in vitro* par transcription à l'aide de l'ARN polymérase du bactériophage T3 en présence de la

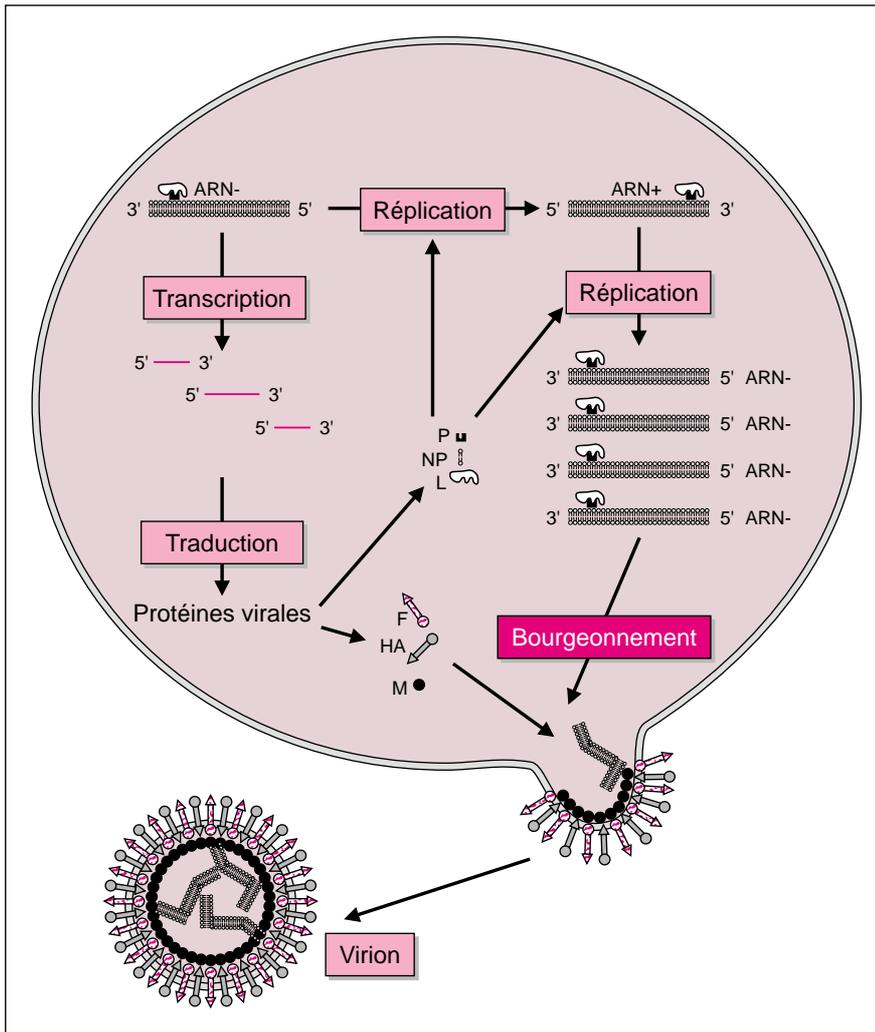


Figure 1. **Représentation schématique de la réplication des virus à ARN.** Les nucléocapsides de ces virus pénètrent dans les cellules grâce à la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la surface cellulaire ou la membrane d'une vésicule d'endocytose (cette étape n'est pas illustrée). La nucléocapside est transcrite en ARNm codant pour les protéines de structure du virus (partie gauche de la figure). Les protéines néosynthétisées (P, N/NP et L dans le cas des Rhabdoviridae et des Paramyxoviridae) assurent la réplication du génome viral (ARN⁻) en antigénome (ARN⁺) puis ce dernier est répliqué pour donner de nouveaux génomes viraux (partie droite de la figure). On notera que l'ARN génomique et l'antigénome sont toujours encapsidés par la nucléoprotéine. Les nucléocapsides renfermant l'ARN bourgeonnent à la surface cellulaire pour former des virions enveloppés. HA: hémagglutinine, F: protéine de fusion, M: protéine de matrice.

nucléoprotéine du virus de la grippe A et des trois protéines portant l'activité polymérase du virus (PB1, PB2 et PA). Dans ces conditions, des structures semblables aux nucléocapsides sont reconstituées *in vitro*. Ces nucléocapsides artificielles sont transfectées dans des cellules qui sont co-infectées par le virus de la grippe. Différentes astuces ont été imaginées

pour favoriser la multiplication d'un virus de la grippe portant le segment d'ARN issu de la manipulation *in vitro*. L'une d'entre elles fait appel au segment d'ARN codant pour la neuraminidase (NA, une protéine de l'enveloppe du virus) de la souche WSN qui permet la multiplication virale sur cellules bovines MDBK tandis que le virus co-infectant qui ren-

ferme un gène NA de la souche HK est incapable de se multiplier sur cette lignée cellulaire (figure 2). Seuls les virus recombinants portant le segment NA de la souche WSN ainsi que les autres segments apportés par le virus co-infectant se répliquent sur cellules MDBK [5]. Dans une autre technique de sélection, on exploite la variabilité antigénique qui caractérise le virus de la grippe. L'ARN codant pour l'hémagglutinine virale (également une protéine de l'enveloppe du virus) d'une souche donnée est transfecté dans des cellules co-infectées par une autre souche virale codant pour une hémagglutinine différente. Les virus recombinants sont sélectionnés grâce à un antisérum qui neutralise le virus portant l'hémagglutinine de la souche co-infectante [6]. Ces stratégies sont susceptibles d'être exploitées de nombreuses manières. Dans une approche, les extrémités non codantes en 3' et en 5' du segment d'ARN renfermant le gène de la neuraminidase du virus de la grippe A ont été remplacées par celles du virus de la grippe B. Cette modification entraîne un ralentissement de la réplication virale en culture cellulaire et une atténuation du virus chez l'animal [7]. La région codant pour l'hémagglutinine du virus de la grippe peut également être légèrement modifiée en introduisant des codons pour des épitopes hétérologues sans destruction du pouvoir infectieux. Ainsi, 12 codons de la boucle V3 de la protéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (souche VIH1-MN) ont été insérés en phase dans le segment codant pour l'hémagglutinine. Le virus chimérique obtenu peut être neutralisé par des anticorps monoclonaux dirigés contre la région V3. Par ailleurs, ce virus est capable d'induire, chez la souris, des anticorps qui reconnaissent la boucle V3 et neutralisent, bien que faiblement, le virus VIH1-MN. Ce virus chimérique induit également chez la souris des cellules T cytotoxiques vis-à-vis de cellules qui sont recouvertes d'un peptide de la boucle V3 [8]. Enfin, dans une autre approche, un des segments d'ARN viral est transformé en un segment codant pour deux protéines grâce à l'ajout d'un site interne d'entrée des ribosomes [9] ou encore grâce à l'emploi de seg-

RÉFÉRENCES

12. Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4477-81.
13. Whelan SPJ, Ball LA, Barr JN, Wertz GTW. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8388-92.
14. Schnell MJ, Buonocore L, Whitt MA, Rose JK. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1996; 70: 2318-23.
15. Garcin D, Pelet T, Calain P, Roux L, Curran J, Kolakofsky D. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J* 1995; 14: 6087-94.
16. Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11563-7.
17. Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter M. Rescue of measles virus from cloned DNA. *EMBO J* 1995; 14: 5773-84.

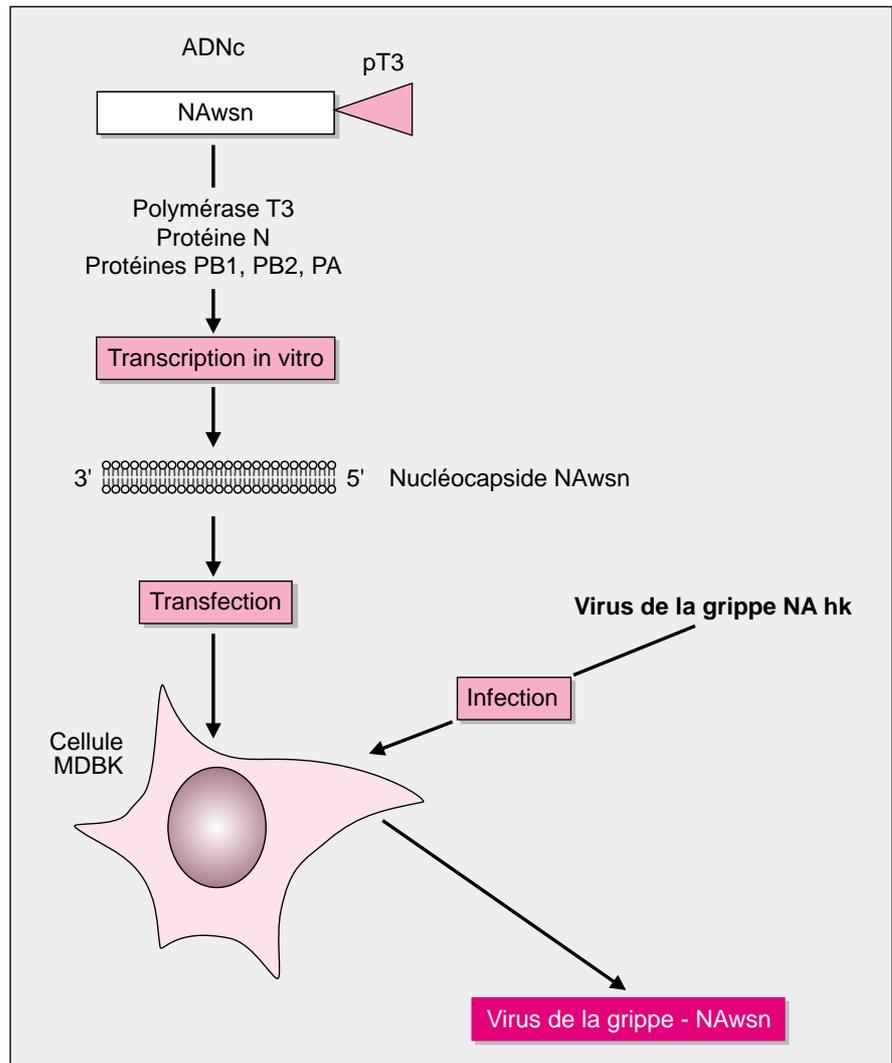


Figure 2. **Stratégie de construction d'un virus de la grippe portant un segment d'ARN modifié.** L'ADNc correspondant à l'un des segments d'ARN du virus de la grippe (NA_{WSN} , rectangle) est cloné en aval d'un promoteur du bactériophage T3 (triangle). La transcription de ce plasmide in vitro par l'ARN polymérase du bactériophage T3 en présence de la nucléoprotéine et des polymérases (PB1, PB2, PA) du virus grippal donne naissance à des nucléocapsides NA_{WSN} artificielles. Celles-ci sont transfectées dans des cellules MDBK qui sont simultanément infectées par une souche du virus grippal NA_{HK} . Un virus recombinant est produit renfermant le segment d'ARN NA_{WSN} issu de l'ADNc.

ments d'ARN codant pour des séquences peptidiques autoprotéolytiques et placés entre deux cadres de lecture ouverts [10]. Ces deux dernières méthodes augmentent le nombre de gènes exprimés par le virus de la grippe et le transforme en un véritable vecteur viral.

Les Rhabdoviridae

Contrairement aux virus de la famille des *Orthomyxoviridae* les autres familles de virus à ARN⁻ possèdent

un génome non segmenté. Dans ce cas il est nécessaire de disposer d'un moyen de produire des nucléocapsides contenant un ARN viral de dimensions plus importantes (12 kb pour les Rhabdovirus). Cela a été réalisé pour la première fois par l'équipe de Karl Klaus Conzelman (Tubingen, Allemagne) avec le virus de la rage [11]. La stratégie suivie est relativement complexe (figure 3). Il s'agit dans un premier temps de cloner un ADNc du génome du virus de la rage en aval d'un promoteur du

bactériophage T7 de telle sorte que sa transcription produit un génome de polarité positive. Les essais avec un ADNc produisant un génome de polarité négative ont échoué. Le plasmide permettant la synthèse du génome positif ainsi que trois autres plasmides renfermant les gènes de la nucléoprotéine (N), de la phosphoprotéine (P) et de la polymérase (L) du virus de la rage placés en aval d'un promoteur du bactériophage T7, sont transfectés dans des cellules sensibles à l'infection par le virus rabique. Les mêmes cellules sont également infectées avec un Poxvirus recombinant (le virus de la vaccine) dont le génome a été modifié par addition du gène de l'ARN polymérase du bactériophage T7. Dans ces conditions, l'équipe de Conzelman [11] a pu récupérer, avec une fréquence faible mais reproductible, du virus rabique infectieux dont le génome porte des mutations silencieuses introduites comme marqueurs. La séquence d'événements intracellulaires aboutissant à la réactivation du génome viral peut être expliquée de la manière suivante. L'ARN polymérase du bactériophage T7, produite à partir du génome du virus de la vaccine, transcrit l'ADNc rabique en un génome de polarité positive ainsi que les trois ADNc codant pour les protéines N, P et L des nucléocapsides. L'ARN du virus de la rage est encapsidé dans des nucléocapsides et il est répliqué en ARN de polarité négative grâce à la polymérase du virus de la rage. Les nucléocapsides néoformés contenant un ARN de polarité négative suivraient la voie normale de multiplication du virus rabique passant par la biosynthèse des protéines de l'enveloppe nécessaires au bourgeonnement du virus à la surface cellulaire. Plusieurs astuces techniques ont contribué au succès de cette approche. (1) La juxtaposition d'un ribozyme à l'extrémité 3' du brin positif de l'ARN viral de façon à engendrer par clivage autocatalytique une extrémité 3' correspondant précisément à celle de la molécule naturelle. (2) La synthèse par la polymérase du bactériophage T7 d'un ARN génomique de polarité positive au lieu d'un ARN de polarité négative (les ARN messagers des protéines de nucléocapsides pourraient

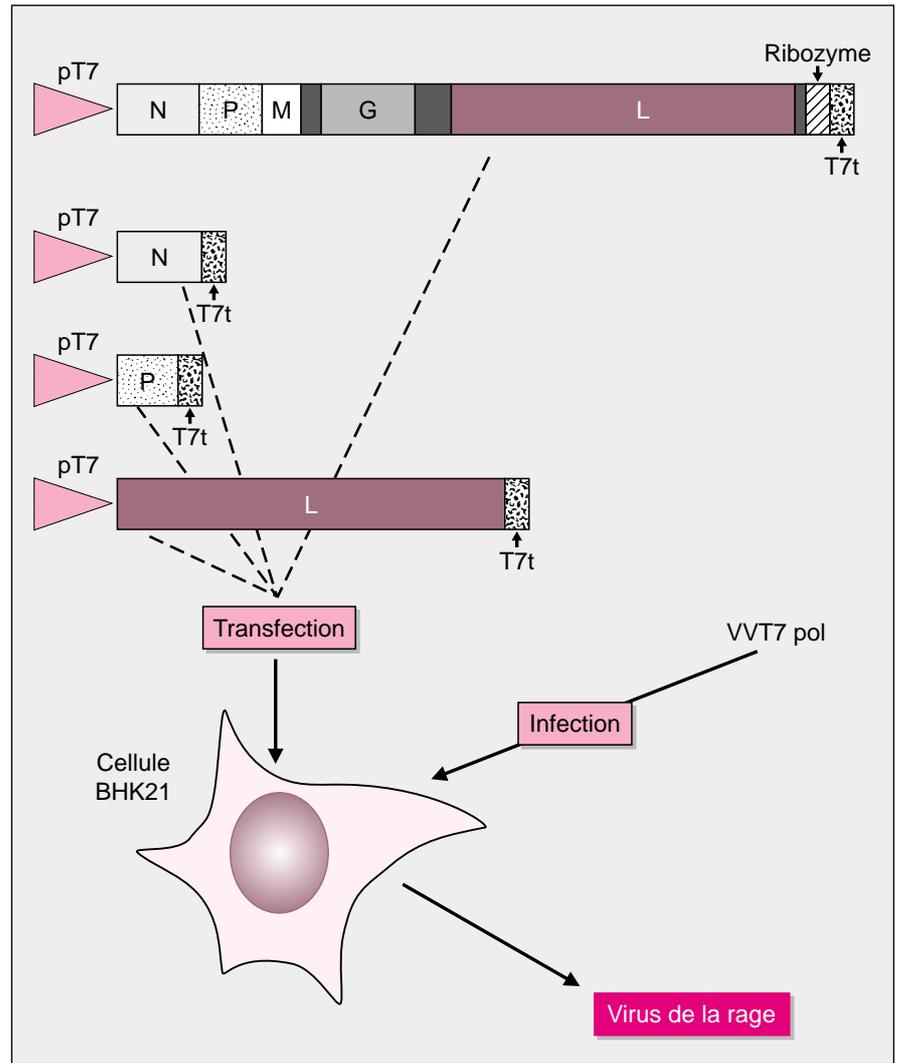


Figure 3. **Stratégie de réactivation du génome du virus de la rage.** Quatre ADNc du virus de la rage placés en aval d'un promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 (pT7) sont utilisés. Le premier code pour une copie complète du génome de polarité positive, suivie d'un ribozyme prélevé au virus de l'hépatite δ et d'un site d'arrêt de la transcription caractéristique du bactériophage T7 (T7t). Trois autres plasmides codent pour les trois protéines de la nucléocapside du virus de la rage (N, P et L). Ces quatre plasmides sont transfectés dans des cellules de hamster BHK21 qui sont également infectées par un virus de la vaccine codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 (VVT7pol). Le virus rabique est réactivé selon ce protocole et débarrassé du virus de la vaccine par centrifugation et filtration.

s'hybrider avec un génome de polarité négative et empêcher son encapsidation). (3) L'emploi de méthodes physiques pour éliminer le virus de la vaccine qui contamine le virus de la rage réactivé.

Une stratégie similaire à celle employée pour le virus de la rage a également été utilisée par deux autres équipes pour obtenir du virus infectieux à partir de l'ADNc du virus

de la stomatite vésiculaire (VSV), un virus bovin prototype des rhabdovirus [12, 13]. L'équipe de Gail Wertz (Birmingham, AL, USA) a montré, par ailleurs, qu'un ADNc permettant la synthèse d'un brin négatif constitue un mauvais substrat pour obtenir un virus infectieux essentiellement parce qu'il contient des arrêts de la transcription pour la polymérase du bactériophage T7 [13]. Plus récem-

ment le génome du VSV a été manipulé de manière à contenir un nouveau cadre de lecture pour la chlo-ramphénicol acétyltransférase [14]. Le virus recombinant obtenu est stable pendant au moins quinze passages en culture cellulaire, ce qui permet d'envisager l'emploi de ce virus comme vecteur d'expression pour d'autres gènes intéressants.

Les Paramyxoviridae

Au cours de l'année 1995, la production de virus infectieux à partir de l'ADNc (16kb) de trois Paramyxovirus différents a été rapportée. Dans le cas du virus de Sendai [15], l'approche expérimentale poursuivie par l'équipe de Dan Kolakofsky (Genève, Suisse) a été semblable à celle utilisée pour réactiver les génomes des Rhabdovirus. Une différence réside cependant dans la méthode d'amplification du virus issu de la transfection. Celle-ci est réalisée dans la cavité allantoïque d'œufs de poule embryonnés. Dans ce protocole expérimental les génomes viraux réactivés subissent une sélection importante ne laissant que ceux qui sont les plus performants. Ainsi, on a pu remarquer que le virus obtenu se distingue du clone moléculaire initial par la substitution de nucléotides entraînant l'inactivation d'un cadre de lecture introduit de manière fortuite lors du clonage. Ce cadre de lecture interférerait avec une multiplication efficace du virus de Sendai. D'autre part, les auteurs de ce travail ont pu mettre en évidence une recombinaison homologue entre le plasmide qui code pour l'ARN génomique et les plasmides permettant la synthèse de protéines de nucléocapside. Cette observation pourrait être exploitée à l'avenir pour manipuler les génomes de ces virus par recombinaison *in vivo*.

Le génome du virus respiratoire syncytial, un Paramyxovirus responsable d'affections sérieuses du nouveau-né, vient également d'être réactivé avec succès par l'équipe de Peter Collins (Bethesda, MD, USA) [16]. Encore une fois, la stratégie est similaire à celle présentée pour les Rhabdovirus. Néanmoins, dans ce cas il s'est révélé nécessaire de transférer, outre les trois gènes de nucléocapsides, un

gène viral supplémentaire, le gène M_2 , qui code pour une protéine qui stimule la transcription du génome viral. Une astuce technologique nouvelle a également été introduite qui consiste à co-infecter avec un variant du virus de la vaccine (*modified vaccinia Ankara*) qui code pour l'ARN polymérase du bactériophage T7 mais ne se multiplie pas dans les cellules de mammifère. Il en résulte que le virus de la vaccine n'interfère en aucune manière avec la détection du virus issu de la réactivation.

Un dernier Paramyxovirus obtenu à partir de son ADNc est le virus de la rougeole [17]. L'approche choisie par l'équipe de Martin Billeter (Zurich, Suisse) a consisté à établir dans un premier temps une lignée cellulaire qui synthétise de manière constitutive la nucléoprotéine (NP) et la phosphoprotéine (P) du virus de la rougeole ainsi que l'ARN polymérase du bactériophage T7 (figure 4). Les gènes correspondant à ces trois protéines ont été placés en aval d'un promoteur fort du cytomégalovirus et des lignées cellulaires humaines transfectées de manière permanente avec ces gènes ont été sélectionnées. La transfection transitoire de ces cellules avec un plasmide codant pour l'ARN polymérase du virus de la rougeole (placé en aval d'un promoteur du bactériophage T7) et un plasmide codant pour un gène complet du virus de la rougeole de polarité positive (également placé en aval d'un promoteur du bactériophage T7) donne lieu à la production de virus infectieux. Un des avantages de ce protocole est qu'il se déroule en absence d'un virus complètement tel que le virus de la vaccine.

Perspectives

La possibilité de manipuler les génomes des virus à ARN⁻ ouvre des perspectives importantes. La première est sans conteste une meilleure connaissance de ces virus. Il est enfin en notre pouvoir de modifier de façon dirigée les gènes viraux ainsi que les régions génomiques non codantes et d'observer les conséquences sur les événements moléculaires de l'infection, sur la multiplication virale et sur le pouvoir pathogène lorsque les modèles

appropriés sont disponibles. On peut s'attendre, grâce à ces techniques, au développement de nouveaux vaccins par atténuation dirigée. Une telle perspective paraît particulièrement intéressante dans le cas du virus respiratoire syncytial, virus pour lequel les méthodes classiques de mise au point de vaccins ont échoué. Pour de nombreux autres virus à ARN⁻ nous disposons de vaccins relativement efficaces (oreillons, rougeole, rage, grippe) qui pourraient toutefois être améliorés par la manipulation de leurs génomes. Ceux-ci pourraient, en outre, servir de points de départ pour l'élaboration de nouveaux vecteurs viraux qui présenteraient des garanties de sécurité associées à leur emploi actuel. Le développement de tels vecteurs pour des applications de vaccination contre des agents pathogènes divers est d'ores et déjà engagé dans plusieurs laboratoires, notamment avec le virus de la grippe [7-9]. L'emploi de virus à ARN⁻ dans des stratégies de thérapie génique est également envisagé selon les principes explorés avec les *Adenoviridae* et les *Retroviridae*. Il s'agirait de construire un virus à ARN⁻ recombinant, capable d'exprimer un gène thérapeutique mais incapable d'effectuer un cycle viral productif. Une lignée cellulaire établie apporterait une fonction virale nécessaire à la production du virus recombinant. Une stratégie de ce type implique nécessairement la réplication du génome viral déficient, sa transcription et une production minimale des protéines de nucléocapside dans les cellules cibles de l'organisme. La difficulté prévisible ici réside dans la réponse immunitaire qui peut être induite vis à vis des protéines de nucléocapside, réponse qu'il faudra maîtriser. Quoi qu'il en soit, des vecteurs de ce type présentent plusieurs avantages potentiels à retenir. Notamment, la réplication des virus à ARN⁻ ne passe pas par un stade intermédiaire à ADN ce qui exclut l'intégration chromosomique pouvant entraîner un dysfonctionnement cellulaire. En outre, on a déjà établi au laboratoire et observé chez l'homme la présence d'infections persistantes par des virus à ARN⁻ sans conséquence néfaste apparente. Enfin, si la porte d'entrée de la plupart de ces virus est la voie respiratoire, de nombreux types cellulaires

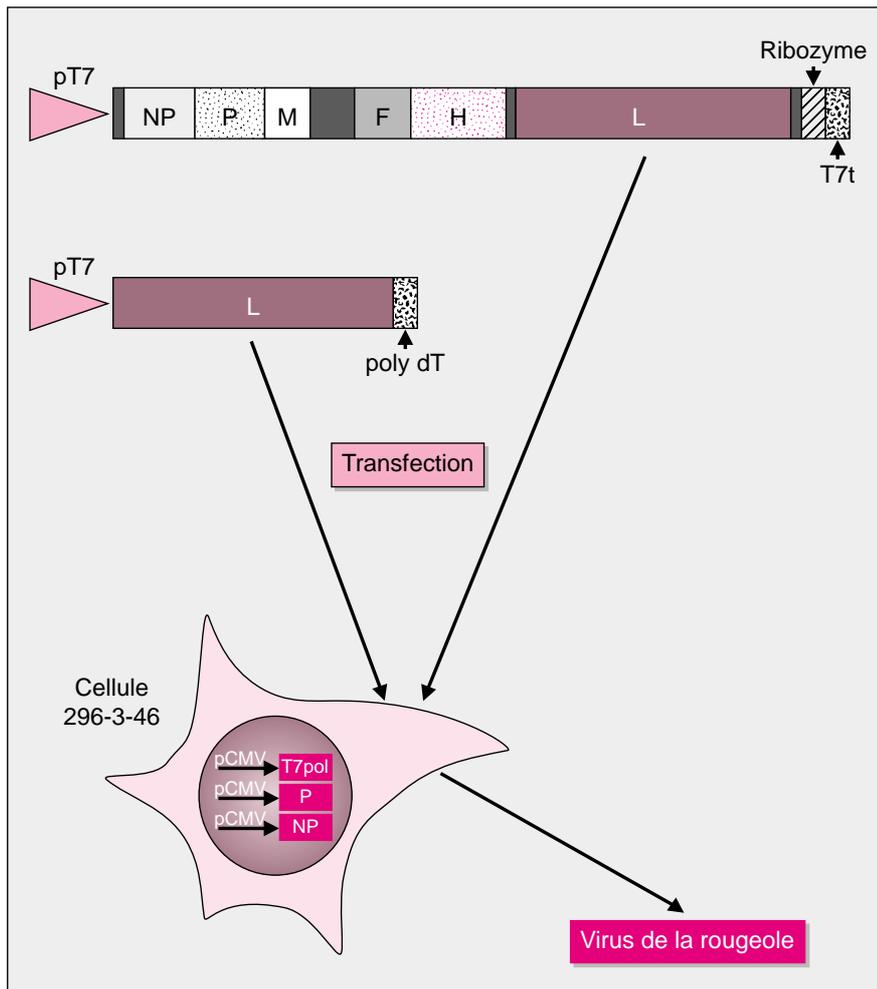


Figure 4. **Stratégie de réactivation du génome du virus de la rougeole.** Un ADNc complet du virus de la rougeole ainsi qu'un ADNc codant pour la protéine L (polymérase) de ce virus sont placés en aval d'un promoteur du bactériophage T7 (pT7). Le premier plasmide renferme un ribozyme en 3' et un site d'arrêt de la transcription spécifique du bactériophage T7 (T7t). Ces deux plasmides sont transfectés dans une lignée cellulaire qui code pour la polymérase du bactériophage T7 (T7 pol) ainsi que pour la phosphoprotéine (P) et la nucléoprotéine (NP) du virus de la rougeole. Les trois gènes étant intégrés dans le noyau de la cellule sont sous le contrôle d'un promoteur du cytomégalovirus humain (pCMV). Le virus de la rougeole est réactivé.

sont permissifs à l'infection virale, laissant prévoir le ciblage de tissus ou d'organes divers. Certes, on ne connaît pas encore la quantité d'information génétique étrangère qui pourrait être intégrée dans le génome d'un virus à ARN⁻ ni quelle en serait la stabilité au cours de passages multiples. La structure linéaire de la nucléocapside n'implique pas de contrainte de taille. D'autre part, le polymorphisme des particules virales de certains de ces virus, qui contraste avec la rigidité des particules icosaédriques de beaucoup de

virus à ARN⁺, laisse prévoir une certaine souplesse dans l'enveloppement de nucléocapsides de dimensions importantes. Une autre difficulté potentielle réside dans l'absence de fiabilité de la réplication, phénomène caractéristique des ARN polymérases qui pourrait être important si aucune pression biologique n'était exercée. Quels que soient les obstacles, il est d'ores et déjà possible d'exploiter les virus à ARN⁻ en tant que nouveaux outils biotechnologiques susceptibles d'être appliqués, à terme, en santé humaine ■

Summary

Genetic manipulation of negative strand RNA viruses: towards new tools in medicine

For many years the molecular engineering of negative stranded RNA viruses has been a major challenge while considerable progress was being made with other virus families leading to biotechnological applications. Recently, new experimental methods have been developed to deliberately alter the genomes of these RNA viruses and particularly viruses that infect man such as influenza, rabies and measles. Whatever the variations in the strategies employed they always take into account the requirement to synthesize the viral nucleocapsid proteins involved in transcription and replication along with the viral RNA to be engineered. These techniques open new perspectives in the design of viral vaccines by deliberate attenuation and in the construction of viral vectors devoted to vaccination or gene therapy.

Remerciements

Le travail réalisé dans le laboratoire dans le domaine des virus à ARN⁻ est soutenu par un contrat de l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (n° 21004) et un contrat du ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche dans le cadre de son programme ACC-SV.

Conférences de l'enseignement de sexologie de l'hôpital Paris Necker École Française de Sexologie

- Mardi 5 novembre 1996 à 20 h 30 : *Conduites sexuelles et culture*
- Mardi 26 novembre 1996 à 20 h 30 : *La sexualité de l'enfant*
- Mardi 17 décembre 1996 à 20 h 30 : *La sexualité de l'adolescent*

Ces conférences se tiendront au Petit Amphithéâtre d'Urologie - 2^e sous-sol, Hôpital Necker, 161, rue de Sévres, 75015 Paris, France.

Pour tous renseignements et inscriptions, s'adresser à :
Madame Claire Gellman-Barroux,
École Française de Sexologie,
3, rue Copernic, 75116 Paris, France.
Tél. : 01 47 27 96 67 - Fax : 01 47 04 40 54

TIRÉS À PART

R. Drillien.