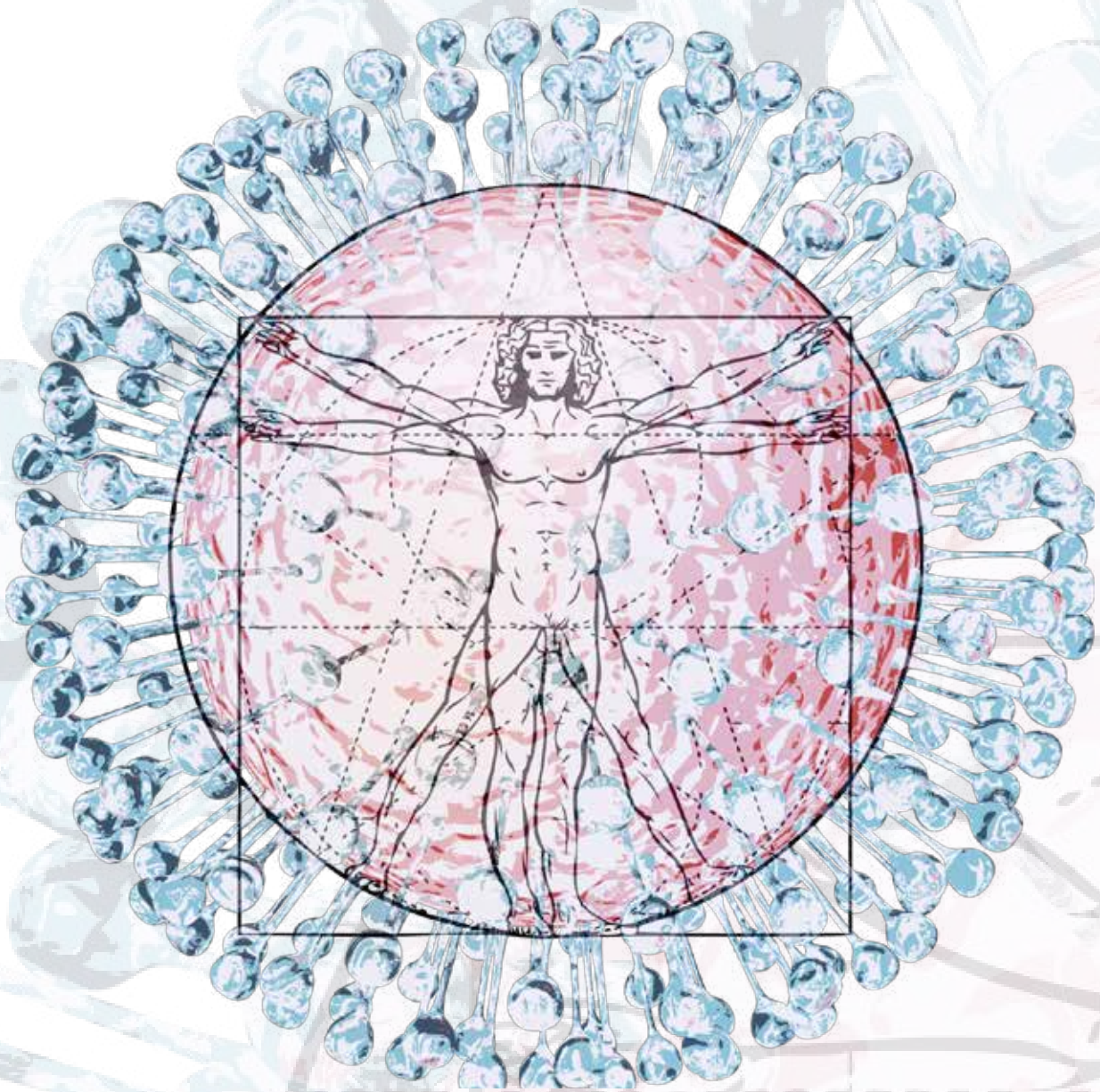


Sciences du vivant et Société

L'homme et les Virus Une cohabitation vitale



**Colloque du
mardi 19 janvier 2016**

Présentent
Dans le cadre du cycle de conférences « Sciences du Vivant et Société »

L'HOMME et les VIRUS Une cohabitation vitale

**Colloque organisé le mardi 19 janvier 2016
dans la Grande Salle des Séances de l'Institut de France**



Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée.....	8
Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa.....	19
Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux.....	32
La dernière génération de médicaments dérivés des virus.....	43
Table ronde : les virus agents thérapeutiques.....	55



A l'initiative de leurs présidents respectifs, Messieurs **Alain Mérieux** et **Jean-Pierre Claveranne**, les Fondations Mérieux et Bullukian se sont associées pour créer des rencontres sous forme de colloque entre les différents acteurs concernés par les découvertes scientifiques récentes et leur impact potentiel sur la société dans les domaines de la santé, l'alimentation et l'environnement.



Aujourd'hui, il est plus que jamais nécessaire de s'informer et de débattre de ces avancées scientifiques. Elles vont, sans aucun doute, façonner de plus en plus notre société par leurs applications.



Monsieur **Jean-Pierre Decor**, ancien directeur scientifique d'Aventis Agriculture, membre de l'Académie d'Agriculture de France, président et administrateur de plusieurs organismes scientifiques et grandes écoles est chargé d'organiser cette réflexion.

Ces évènements se déroulent dans des lieux particulièrement appropriés à ce type de débat comme le Centre de Conférences des Pensières, sur les bords du lac d'Annecy, le Collège des Bernardins ou l'Institut de France à Paris

Les virus géants : Histoire et conséquences d'une découverte non programmée

Pr Jean-Michel Claverie

*Institut de Microbiologie de la Méditerranée
Université d'Aix-Marseille
31 Chemin Joseph Aiguier
13402 Marseille Cedex 20*



Bactériophages : De la médecine au fondamental et vice-versa

Dr Laurent Debarbieux

*Département de Microbiologie
Institut Pasteur
25 Rue du docteur Roux
75724 Paris Cedex 15*



Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux

Dr Clément Gilbert

*Laboratoire Ecologie et Biologie des
Interactions
Université de Poitiers
6 Rue Michel Brunet
86073 Poitiers Cedex 9*



La dernière génération de médicaments dérivés des virus

Pr Philippe Moullier

*Institut de Recherche en Santé
Université de Nantes
8 Quai Moncousu
44007 Nantes Cedex 1*





Dr Jean-Pierre DECOR

Science et Société,
Fondations Mérieux et
Bullukian.

Dr Jean-Pierre DECOR.- Mesdames, Messieurs, bonjour et bienvenue.

L'objectif de nos colloques est de nous familiariser avec les découvertes scientifiques les plus récentes tournées vers le progrès social.

À cause de sa complexité croissante et de sa grande diversité, la science est de moins en moins accessible, alors que les découvertes scientifiques façonnent de plus en plus notre société par leurs applications technologiques et qu'elles sont souvent accompagnées d'informations alarmantes.

Connaître afin de se faire une opinion, c'est l'opportunité qui est offerte par ce type de colloque.

À ce propos, je tiens à remercier chaleureusement les présidents des deux Fondations qui soutiennent cette association, MM. Mérieux et Claveranne avec la volonté de poursuivre l'œuvre des initiateurs de ces conférences, le docteur Charles Mérieux et le baron Edmond de Rothschild.

Les remerciements s'adressent également à l'Institut de France et à l'Académie des Sciences qui nous accueillent dans cette magnifique salle.

Avant d'introduire le sujet de la journée, je vous rappelle qu'un compte rendu sera disponible sous forme écrite, une brochure vous sera envoyée et également par internet sur le site www.institut-vivant.org.

Sur ce site, les précédents sont également disponibles. Nous avons encore des brochures des 3 derniers colloques que nous pouvons vous transmettre sur demande.

Notre journée se déroulera de la manière suivante :

Ce matin, nous avons 3 interventions ; la pause déjeuner aura lieu au rez-de-chaussée et cet après-midi, nous poursuivrons avec les aspects thérapeutiques des virus. Ces interventions seront suivies d'une table ronde où nous serons en interaction avec les quatre conférenciers.

Entre chaque exposé, nous nous limiterons aux questions de compréhension ; les questions générales seront discutées en fin d'après-midi.

Le thème choisi cette année est « l'Homme et les virus ». Nous avons retenu ce thème car notre vision est souvent manichéenne. Nous avons un fort besoin de classer les choses en bien ou en mal et de discerner ce qui peut, soit nous bénéficier, soit nous nuire. Ainsi, jusqu'à maintenant nos connaissances des virus se focalisaient sur les virus pathogènes. La virologie moderne et les biotechnologies ont fait évoluer les relations hôtes-virus et mettent en pièces un certain nombre d'idées reçues.

Les virus ne sont pas forcément plus petits que les bactéries, il se pourrait même qu'ils soient vivants, vu qu'ils développent une immunité. Les virus ne sont pas tous pathogènes, loin s'en faut. Ils sont redoutables lorsqu'ils décident d'utiliser les cellules de notre organisme pour s'y multiplier. Toutefois, les hommes et les virus ne sont pas des ennemis héréditaires.

Le corps humain, dans lequel ils passent inaperçus, en contient des milliards. A cette échelle ils forment un équilibre subtil avec les bactéries. Ils peuvent être bénéfiques à travers leur rôle d'agent prophylactique, voire thérapeutique : bactériophages, contrôle des cellules tumorales et vecteurs pour la thérapie génique.

Les virus jouent également un rôle bénéfique dans les écosystèmes.

Après ces quelques mots, je vais, sans attendre, introduire le premier conférencier.

Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée



**Pr Jean-Michel
CLAVERIE**

*Institut de Microbiologie
de la Méditerranée
Université d'Aix-Marseille
et CNRS*

Dr Jean-Pierre DECOR.- Jean-Michel CLAVERIE est professeur praticien hospitalier de génomique et de bioinformatique à la faculté de médecine d'Aix-Marseille, directeur de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée, directeur du Laboratoire d'Information Génomique et Structurale. Durant sa carrière, débutée en 1973 au CNRS, Jean-Michel CLAVERIE a fréquenté un grand nombre d'instituts : Monod, Salk, Pasteur, NIH. Avant de revenir en France, il a passé une année comme directeur de la recherche bioinformatique à Incyte Pharmaceuticals à Palo Alto. Il est auteur ou coauteur de plus de 200 publications et auteur d'un best-seller « *Bioinformatics for dummies* », autrement dit « *Bioinformatique pour les nuls* ».

Après la découverte de Mimivirus en 2003, le laboratoire qu'il co-dirige avec Chantal ABERGE, s'est focalisé sur l'étude des virus géants.

Grâce à lui, nous sommes entrés dans une nouvelle ère où les concepts de base de la virologie peuvent à nouveau être questionnés : Qu'entend-on par virus ? Par quelle différence fondamentale se distinguent-ils des autres micro-organismes ? Comment ont-ils ponctué l'évolution de la vie sur notre planète ?

Jean-Michel CLAVERIE va nous éclairer sur toutes ces questions.

Pr Jean-Michel CLAVERIE.- Je vous remercie pour cette flatteuse introduction. Je suis très impressionné d'intervenir dans cette salle dans laquelle se sont exprimés de

très grands savants.

Vous allez entendre une histoire fascinante de découvertes non programmées dont on ne sait pas jusqu'où elles vont nous mener. Il s'agit de micro-organismes dont on ignorait l'existence, jusqu'à récemment, sur cette planète.

Tout d'abord un rappel historique de la théorie des germes de Pasteur, qui est considérée comme son aboutissement scientifique. Il énonce que les maladies infectieuses transmissibles sont en fin de compte dues à des bactéries, des micro-organismes que l'on peut cultiver et voir au microscope optique.

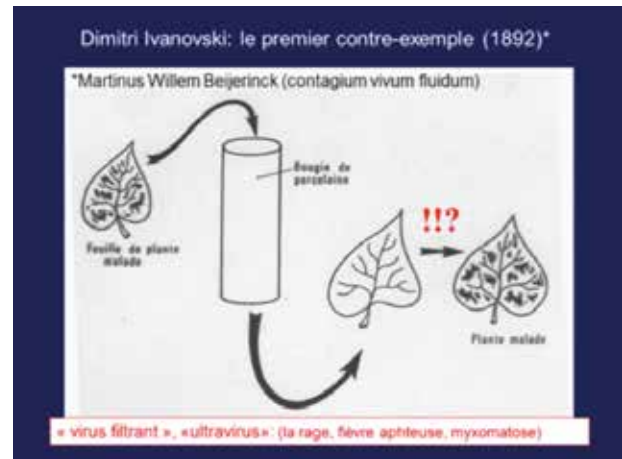
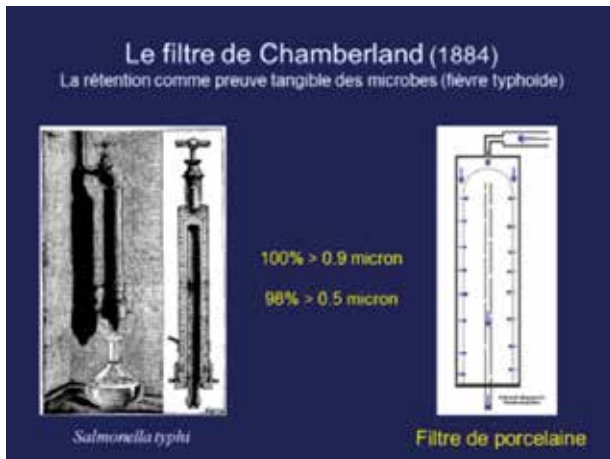
C'est la fin de la génération spontanée et de la théorie des « miasmes », selon laquelle de mauvaises odeurs pouvaient vous rendre malade.

Il faut toutefois mentionner que, deux siècles auparavant, Antoni van Leeuwenhoek avait découvert l'existence des micro-organismes cellulaires. Antérieurement, des auteurs romains et hindous, cinquante ans avant Jésus Christ, avaient mentionné que les maladies dans les marais étaient dues à de petits animaux invisibles...

Au cours de l'histoire des sciences, cette idée selon laquelle des êtres microscopiques peuvent être responsables de maladies infectieuses est un thème récurrent.

Toutefois, la théorie des germes a été une grande hypothèse, dont l'originalité fut d'être associée à un appareillage scientifique et un mode opératoire.

C'est le filtre de Chamberland, assistant de Pasteur, qui a permis d'isoler un très grand nombre de micro-organismes.



Le principe en était simple : en présence d'une pathologie, pour en connaître la cause, il suffisait de réaliser un fluide et de le présenter sur un filtre de Chamberland. Si elle persistait, ce n'était pas une bactérie qui en était la cause. Si elle s'arrêtait, c'était parce que la bactérie était retenue sur le filtre.

Comme toujours en sciences, il y a eu très rapidement un contre-exemple.

La même année où Pasteur, considéré comme le savant le plus important de son siècle, fêtait son jubilé pour ses 70 ans, un botaniste allemand, totalement inconnu, Dimitri Ivanovski, réalisait l'expérience de Chamberland pensant trouver l'origine de la maladie de la mosaïque du tabac. A partir de feuilles de tabac malades dont il avait produit un fluide, après filtration, il s'attendait à ce que la maladie ne soit pas transmissible. Or, elle le fut (à des feuilles saines). Il était donc en présence d'un agent infectieux qui passait à travers le filtre de Chamberland...

Très rapidement ce protocole initialement destiné à découvrir de nouvelles bactéries, a servi à découvrir, à l'inverse, une autre catégorie d'agents infectieux. On les a longtemps appelé des virus filtrants ou ultravirus.

Ainsi, par définition, les virus causant des maladies ont été les micro-organismes passant à travers le filtre de Chamberland.

La notion de virus est restée extrêmement vague pendant plus de 50 ans, jusqu'à ce que l'on puisse enfin les mettre en évidence et les visualiser grâce à l'invention du microscope électronique en 1945.

On attribue très souvent l'origine de la virologie à Martinus Beijerinck qui, 10 ans plus tard, avait reproduit et confirmé les manipulations d'Ivanovski.

En fait, c'était plutôt une régression. Certes Beijerinck concevait que les virus étaient des objets très différents des bactéries mais il était revenu à une sorte de théorie des « miasmes » dont le facteur était le « *contagium vivum fluidum* ». Le virus n'était même plus une particule, c'était une espèce de fluide contagieux. Il est donc un peu dommage de lui attribuer systématiquement l'origine de la virologie !

Alors qu'est-ce qu'un virus ?

Après beaucoup d'années de controverses sur l'origine et la nature même des virus (protéiques, nucléoprotéiques, vivants, non vivants, identiques ou très différents des bactéries ...), Lwoff est le premier à avoir énoncé les critères permettant de discriminer un virus par rapport à un organisme cellulaire. Ce sont les fameux critères de Lwoff qui sont curieusement des affirmations négatives ; preuve que les idées n'étaient pas très claires...

Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée

D'après Lwoff, un virus est invisible au microscope optique ; à cause de sa taille, il passe à travers le filtre de Chamberland. Il n'est pas cultivable en l'absence de cellule vivante. Il n'a pas de système de production d'énergie, ce que l'on appelait un système de Lipmann à l'époque (en fait, il ne produit pas d'ATP). Il n'a pas de système de traduction de protéines et n'a pas de ribosome. Il ne se réplique pas en se divisant.

Lwoff, en 1966, dans une de ses publications les plus célèbres, exaspéré par les querelles de son temps, concernant la nature des virus, écrivait : « *les virus sont des virus* », et il poursuivait : « *oui, les virus ne sont pas vivants, il n'y a pas de recouvrement entre le monde des virus et le monde des microbes bactériens ou cellulaires* ».

La première anicroche à cette vision simple non recouvrante du monde des virus est la découverte de Mimivirus. Elle a eu lieu en deux temps.

En 1992, à Bradford en Angleterre, une épidémie de légionellose conduit les offices de santé publique à chercher dans toutes les tours de refroidissement aux alentours, les amibes qui hébergeraient ces légionelles. Ces bactéries se développent dans les amibes et ne sont, habituellement, pas trop infectieuses pour l'homme. Tim Rowbotham trouve dans ces amibes des petites particules rondes. Il pense avoir découvert un nouvel agent de pneumonie qu'il a appelé Bradfordcoccus car les légionelles ressemblent normalement à des bâtonnets. Il tente de mieux l'analyser, d'en faire le séquençage, de le cultiver sans y parvenir. Toutefois il conserve cet échantillon dans un congélateur.

Quelques années plus tard, en 2002, cet échantillon est arrivé à Marseille dans le laboratoire de Didier Raoult avec lequel je collaborais à l'époque pour faire la génomique de bactéries intracellulaires du type rickettsies. Encore une fois, ce laboratoire n'a pas réussi à cultiver cette

bactérie et avant de jeter l'échantillon, nous l'avons observé au microscope électronique. Il se présente sous une forme qui fait penser à un virus, mais de taille extrêmement importante soit 0,6 à 0,7 μm de diamètre. Ainsi, il est parfaitement visible au microscope optique. La couverture de la revue « *American Scientist* » montre à la même échelle ce virus par rapport aux virus du Sida et du rhume.



Il s'agit d'un véritable changement d'échelle. C'était le premier virus dont la taille était celle d'une cellule, que l'on pouvait voir au microscope optique et qui ne passait pas à travers le fameux filtre de Chamberland !

Son séquençage complet, a mis en évidence un génome de plus d'un million de paires de bases (1.18 Mb), ce qui le situe très au-delà de tous les virus connus. Le plus gros virus découvert à cette époque était un virus d'algue de Chlorelle qui contient 330 Kb de DNA. Le changement d'échelle était gigantesque.

C'est la première fois qu'un virus était doté d'une complexité génomique plus importante que de nombreuses bactéries parasites causant des maladies comme la syphilis ou le typhus. A l'inverse, on a trouvé depuis des petites bactéries exotiques et bizarres comme *Carsonella Ruddi* ou *Buchnera* qui ont moins de 150 protéines.

Le monde des virus est donc totalement recouvrant avec le monde des organismes cellulaires, en tout cas avec celui des procaryotes.



La dernière grande surprise a été de découvrir dans ce génome une dizaine de protéines impliquées dans la traduction. Il faut se rappeler que les virus, par définition, ne possèdent pas de système de traduction, car ils utilisent celui de la cellule hôte.

Des protéines sont absolument essentielles pour la traduction. Ce sont les aminoacyl-ARNt synthétases capables de mettre chaque aminoacide sur l'ARNt correspondant. Il est très étonnant d'en trouver quatre. En présence d'une seule, on aurait pu penser qu'il y avait eu un transfert latéral de gène du monde cellulaire vers ce virus, mais quatre au niveau stochastique, cela fait beaucoup.

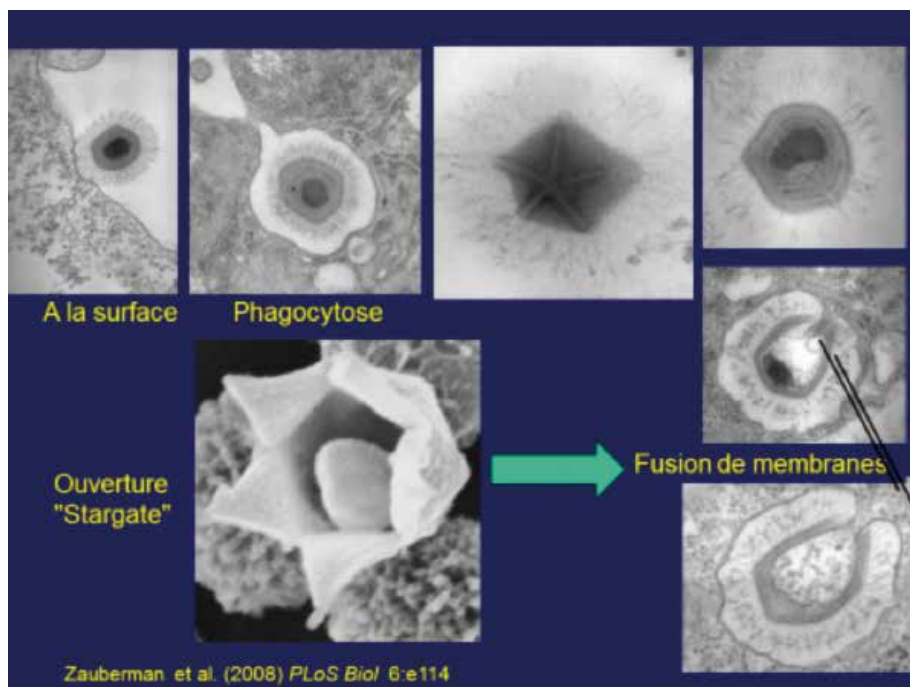
D'autres facteurs d'élongation et de régulation de la traduction étaient également présents. C'était la première anicroche aux critères de Lwoff. Toutefois, pour que la traduction puisse fonctionner, il aurait fallu avoir 20 de ces enzymes. Il s'agissait donc d'une situation intermédiaire bizarre qu'il a fallu expliquer.

L'origine de ce virus géant pourrait être une protocellule ou une cellule ancestrale qui avait progressivement perdu son système de traduction au profit de l'hôte qu'elle infectait. D'origine cellulaire, Mimivirus serait alors le résultat d'une évolution réductive, processus classique chez les parasites cellulaires (rickettsies, mycoplasmes). En effet, un parasite n'est pas obligé de garder toutes ses fonctions, beaucoup d'entre elles peuvent être supplées par l'hôte infecté.

Examinons rapidement la biologie de Mimivirus.

Il infecte les amibes *Acanthamoeba*, selon le mécanisme suivant :

Détecté à sa surface elle l'ingère, le phagocytose et à l'intérieur de la vacuole il se forme une structure, appelée la « Stargate », qui s'ouvre et libère une membrane lipidique se trouvant à l'intérieur de la capsid du virus.



Cette membrane fusionne avec celle du phagosome de la vacuole de l'amibe. L'intérieur de la particule peut rejoindre le cytoplasme et c'est ainsi que l'infection commence : phagocytose, fusion de membrane et initiation du cycle de réplication

directement dans le cytoplasme. Il n'y a pas de phase dite d'éclipse (i.e. où toute trace du virus disparaît) : on voit parfaitement l'intérieur du virus qui perdure dans le cytoplasme et qui va progressivement se transformer en un organisme gigantesque au centre de l'amibe

Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée

et générer un millier de nouvelles particules virales. On l'appelle l'usine à virions.



Le véritable virus est en fin de compte cet organisme transitoire capable de générer des milliers de nouvelles particules une fois en situation au sein de l'amibe. C'est pour constituer cette usine que Mimivirus a besoin de son millier de gènes.

Ce virus n'intervient pas au niveau du noyau de l'amibe qui est totalement préservé.

Nous avons nous-même commis cette erreur d'interprétation lors de la première publication sur ce virus. Nous avons confondu cette usine à virions avec le noyau de l'amibe.

Nous avons par la suite réalisé la séquence complète de ce génome et avons découvert que plus des deux tiers des séquences des protéines codées par ce virus ne ressemblaient à rien de connu. Nous nous sommes alors posé la question de savoir où nous pourrions trouver des homologues.

Il se trouve qu'à ce moment, Craig Venter était en train de mettre au point sa première banque de données « métagénomiques » en prélevant de l'ADN au hasard des océans et en le séquençant. Les seuls homologues trouvés à quelques protéines de Mimivirus étaient dans les banques de gènes collectés dans la mer

Cela nous a conduits naturellement à rechercher d'autre de ces virus dans l'eau de mer.

À cette même époque, des océanographes commençaient à s'intéresser aux virus pour expliquer l'évolution des efflorescences qui

peuvent prendre la dimension d'un demi-continent. Une efflorescence du plancton marin *Emiliana huxleyi* peut atteindre des mégatonnes et 450 km de diamètre en quelques jours. Les océanographes ignoraient l'origine de ce phénomène et la raison de sa disparition tout aussi rapide.



Declan Schroder et William Wilson ont attribué ce phénomène à *Emiliana huxleyi* dont les cellules ont des boucliers de calcite spécifique. Les falaises de Douvres et de Calais sont à 95 % constituées de ces petits boucliers de calcite.

La disparition de ces efflorescences s'explique par une infection virale. Le virus responsable (EhV86) qui comporte un génome de 406 Kb a été pendant un temps le plus gros virus connu après Mimivirus.



Le rôle très important des virus dans la mer a ainsi été mis en évidence

Le professeur Curtis Suttle (Université de Colombie britannique à Vancouver) a estimé qu'environ un tiers des micro-organismes



marins sont tués chaque jour par une infection virale.

A la surface de la terre, l'oxygène est à 50% d'origine marine. Il faut donc veiller à ce que cet équilibre entre les virus et leurs hôtes ne soit pas trop perturbé dans les océans.

Ces virus sont totalement à la base de l'équilibre des populations de micro-algues ou de planctons dans la mer.

Nous sommes allés chercher d'autres virus le long de la côte chilienne qui est l'une des plus micro-diverses du monde à cause des remontées des eaux profondes (« upwelling ») tout le long de cette grande côte rectiligne. Dans des sédiments prélevés lors d'un séjour à l'ECIM (Estacion Costera de Investigaciones Marinas, Las Cruces), nous avons eu la chance d'isoler un nouveau virus de la même famille que Mimivirus, nous l'avons appelé *Megavirus chilensis*.

Il est légèrement plus gros avec une structure identique. Il possède une couche de fibres résistantes constituées de sucres comparables à celles qui entourent les spores bactériennes.

Il est probable que cette enveloppe est détectée par l'amibe qui traite alors le virus comme une bactérie, sa proie habituelle. Mégavirus transite par la vacuole avant d'initier un cycle réplcatif similaire à celui de mimivirus.

Ce nouveau virus comporte plus de gènes que Mimivirus, dont 7 aminoacyl-ARNt synthétases au lieu de quatre.

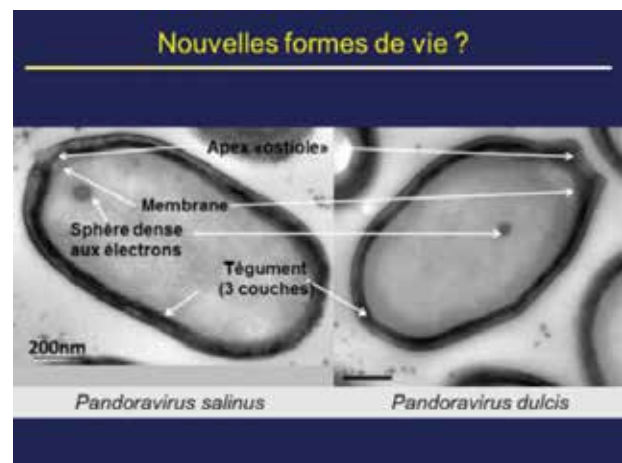
Cette découverte renforce l'hypothèse que ces virus géants ont une origine (proto)cellulaire et auraient progressivement perdu leur capacité d'effectuer eux-mêmes la traduction de leurs gènes en protéines.

Depuis, beaucoup d'autres virus de la même famille ont été découverts et chaque fois, on retrouve les mêmes éléments d'un système de traduction « fossile » confirmant l'hypothèse d'une évolution réductive commune.

En 2011, de nombreux autres virus à grands génomes ADN sont venus compléter notre collection, mais leur complexité génomique semblait avoir atteint une limite maximale aux alentours de 1,2Mb et environ 1100 gènes.

A côté des poxvirus et des chlorovirus (infectant des algues communes appelées Chlorelles), ces virus nouvellement découverts infectent également des protistes unicellulaires marins. Avec des génomes, d'environ 0,5 Mb, ils constituent des familles virales dominantes pour la régulation des populations planctoniques marines.

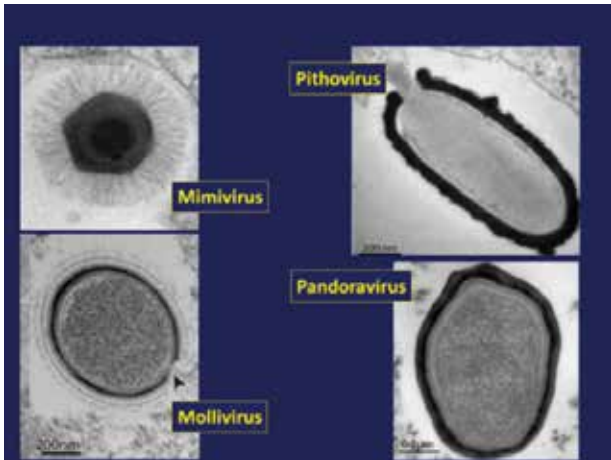
Poursuivant nos recherches de nouveaux virus au Chili et en Australie, nous avons obtenus deux échantillons au comportement identique. Au contact de cultures d'amibes, on y voyait se multiplier rapidement des particules d'un aspect nouveau, de formes irrégulières, parfaitement visibles au microscope optique, que l'on ne voyait jamais se diviser.



Nous avons pensé immédiatement à une contamination entre les deux échantillons car cela est fréquent en virologie environnementale. Toutefois les gels protéiques ont confirmé que ces « nouvelles formes de vie », comme nous les appelions alors, avaient des compositions distinctes. Ils se présentent comme de gros sacs vides avec un tégument à 3 couches, une sphère dense aux électrons, mais trop petite pour correspondre à l'ADN, et qui se réplique de manière très bizarre. Nous avons appelé celui venant du Chili *Pandoravirus salinus* et celui

Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée

venant de Melbourne *Pandoravirus dulcis*.



La surprise a été de découvrir que le génome de *Pandoravirus salinus*, était de 2,8 Mb et d'une composition totalement différente de celle des Mimivirus.

Était-ce un virus ? Selon la définition de Lwoff : « pas de protéine ribosomale codée, pas de division, pas d'enzyme de production de l'ATP ». En l'absence de gènes correspondants, *Pandoravirus salinus* est donc forcément un virus.

En revanche, nous n'avons détecté dans son génome aucun homologue d'une protéine majeure de capsidite pourtant un élément récurrent chez les grands virus à ADN.

Plus étonnant, 94 % des gènes codés dans ce virus n'ont aucune ressemblance avec des gènes du monde vivant ; 6% ont des similarités qui se distribuent entre des organismes eucaryotes ou des bactéries.

Voilà où nous en sommes donc en 2013.

Parrapport à Mimivirus nous sommes en deçà du monde bactérien et nous commençons à approcher le monde eucaryote. En effet, les plus petites cellules eucaryotes parasites connues ont des génomes moins complexes que les Pandovirus. Le monde viral recouvre donc à la fois le monde cellulaire eucaryote et le monde bactérien.

Nous pensions avoir atteint une asymptote à 1,2 Mb. Nous sommes maintenant à 2,8 Mb. Si vous me demandez quelle est la limite pour la taille du génome d'un (prochain) virus,

je n'en ai plus aucune idée. Cela peut aussi bien être 10 Mb.

Ces Pandovirus commencent leur cycle infectieux de la même façon que Mimivirus :

- Une phagocytose par amibe suivie d'une fusion de la membrane interne du virion avec la membrane de la vacuole.

Mais il s'en distingue ensuite par

- Le déchargement du contenu intérieur que l'on ne voit pas. On ne sait pas où est l'ADN de ce virus (phase d'éclipse) ;
- La dissolution rapide du noyau de l'amibe après le début de l'infection.

Contrairement à Mimivirus, le noyau de l'amibe ne reste pas intact. Après trois heures d'infection par Pandoravirus, un noyau fantôme se met à engendrer de nouvelles particules en forme d'amphores. Ces virions se construisent d'une manière inédite. Comme si l'on fabriquait une bouteille en même temps qu'on la remplissait : en partant d'une sorte de goulot à l'extrémité de la particule (l'apex) on observe l'élongation progressive de sa paroi (un tégument épais formé de trois couches longitudinales distinctes) délimitant un volume ouvert qui semble simultanément se remplir. Ce dernier finit par devenir une particule virale parfaitement mature et infectieuse.

A la fin du cycle de réplication l'amibe est remplie d'une centaine de particules virales nouvelles de forme beaucoup plus variable que celles observées pour les particules icosaédriques toutes identiques de Mimivirus .

Malgré la grande taille de leur génome, ces virus sont paradoxalement beaucoup plus dépendants de la cellule et du noyau que ne le sont les Mimivirus. Ils ont besoin du noyau parce qu'ils ont des introns dans leurs gènes et le virion n'embarque pas de machinerie de transcription virale. Il est donc indispensable de passer par le noyau pour initier la transcription des gènes. Ce système viral géant est totalement différent de Mimivirus.

En phylogénie, cette famille est complètement



à part. Il ne s'agit pas d'un Megaviridae ; nous l'avons appelé Pandoravirus car nous pensons que ses propriétés inédites ouvrent une boîte de Pandore quant au paradigme actuel de la virologie.

Notre propre hypothèse (proto)cellulaire pour les Mimiviridae est ainsi mise à mal par les Pandoravirus. Si l'origine de ces derniers est également cellulaire, alors elle doit être différente, car les deux types de virus n'ont aucune similarité génétique. C'est donc une origine ancestrale mais distincte qu'il faut maintenant postuler.

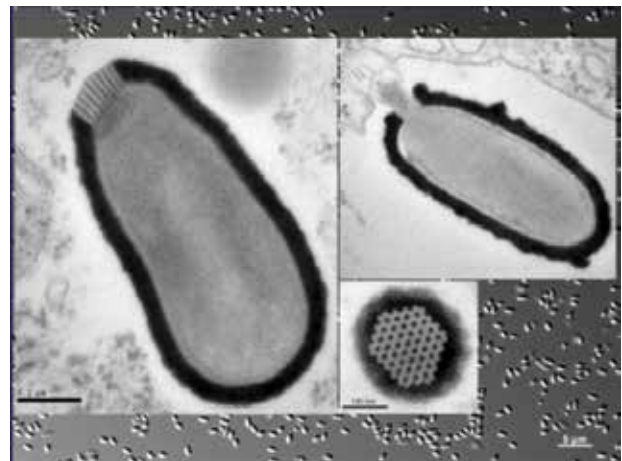
Il y a trois ans, nous avons pris contact avec une équipe de recherche russe spécialiste de la microbiologie du pergélisol, dont la publication démontrait qu'il était possible de ressusciter une plante à partir de tissus conservés dans des couches de terrain datant de 30 000 ans, donc contemporain à l'extension de l'homme de Neandertal. Répondant à notre requête, ils nous ont procuré des échantillons provenant de l'extrême nord de la Sibérie orientale. Le site précis, très étudié, correspond aux berges de la rivière Anyouysk dont les méandres ont creusé de véritables falaises dans le sol gelé en permanence. Il y est donc possible d'atteindre des couches d'un âge spécifique en y creusant horizontalement, donc sans courir le danger de contaminer les échantillons par des sols plus récents, comme quand on creuse verticalement à partir de la surface. L'échantillon que nous avons exploité a été prélevé 23 m au-dessus de la rivière dans une couche datée de 28 000 ans au carbone 14.

Ce n'est qu'un début car ce site offre la possibilité de remonter jusqu'à 1 million d'années. Nous travaillons actuellement sur des échantillons qui ont 600 000 ans.

Après avoir mis en contact les échantillons avec les amibes, nous avons observé au microscope optique ce que nous pensions être des Pandovirus.

Au microscope électronique, la structure est apparue totalement différente, le tégument

est cette fois constitué de petites couches perpendiculaires à la surface. La coupe sagittale révèle une espèce d'élégant nid d'abeille. Ce sont, à nouveau, des virus totalement différents. Ils ne semblent pas dépendre du noyau qui reste en bon état jusqu'à la fin du cycle de réplication. Il s'agit d'un nouveau genre de virus à la réplication exclusivement intra-cytoplasmique. Comme les Mimivirus, ils ne dépendent pas de la machinerie transcriptionnelle de la cellule. Là encore, deux tiers des gènes sont inconnus. La particule mesure plus de 1,5 µm de long avec un génome plus petit codé par une molécule d'ADN de 610 Kb.



Ce résultat a eu beaucoup d'écho médiatique, parce qu'il pose la question suivante: si on est capable de ressusciter des virus non pathogènes dans le pergélisol sibérien de 30 000 ans, quid des virus pathogènes comme celui de la variole ? La question est d'autant plus d'actualité que le réchauffement climatique se fait particulièrement sentir dans les régions arctiques.

La boîte de Pandore initiale était une grande amphore, un « Pithos ». C'est la raison pour laquelle nous avons baptisé ce nouveau virus « *Pithovirus sibericum* » pour le distinguer des précédents Pandovirus

C'est encore un autre type de virus géant que nous venons de ressusciter du même échantillon de pergélisol que celui dont provenait *Pithovirus sibericum*. Celui-ci apparaît tantôt sphérique, tantôt sans forme bien définie (« mou ») une fois dans

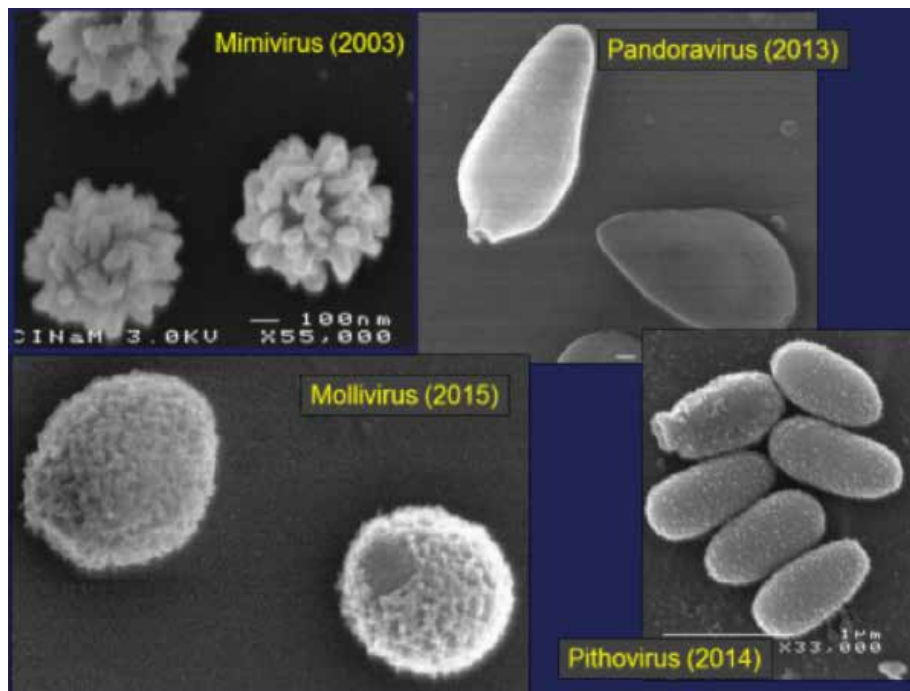
Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée

les vacuoles de phagocytose de l'amibe. Pour cela nous l'avons baptisé « *Mollivirus sibericum* ». L'échantillon initial ne contenait pas un, mais deux virus congelés.

Mollivirus se caractérise par une particule d'un diamètre d'environ 0,6 micron de diamètre, dont la structure interne n'a rien à voir avec les trois autres familles de virus géants. Une fois dans l'amibe son cycle de réplication dure environ 6 heures. Au début il doit passer par le noyau de son hôte, faute d'embarquer sa propre machinerie de transcription. Avec un génome ADN d'environ 600 kb donc

comparable à celui de Pithovirus, son mode de réplication le rapproche pourtant plus de celui du géant Pandoravirus.

Nous sommes maintenant en présence de quatre familles de virus géants identifiés à partir des seules amibes du genre *Acanthamoeba*. Ils sont tous différents au plan structural, génomique et physiologique. Clairement, nous sommes encore loin de connaître la diversité des virus géants. Que tirer comme leçon de ces premiers épisodes de la saga des virus géants ?



Chaque fois nous avons un thème récurrent: au moins deux tiers des gènes de ces virus n'ont aucun homologue parmi les gènes connus. Cela pose bien sûr la question fondamentale de l'origine de ces protéines qui n'ont pas été empruntées au monde cellulaire ancestral.

Risquons une hypothèse en nous situant dans le premier milliard d'années de l'existence de notre planète: l'arbre de la vie actuel y prend racine avec l'apparition de l'ancêtre commun LUCA (Last Universal Common Ancestor) précurseur de bactéries, des archaeobactéries et des eucaryotes.

Des analyses récentes suggèrent même que les eucaryotes ne mériteraient plus leur propre domaine, mais seraient dérivés d'un groupe particulier d'archaeobactéries. Les eucaryotes semblent avoir divergé du domaine archaeobactérien largement après le début de leur radiation.

Mais quid des virus, totalement absents de ce scénario et grands absents de l'arbre de la vie ?

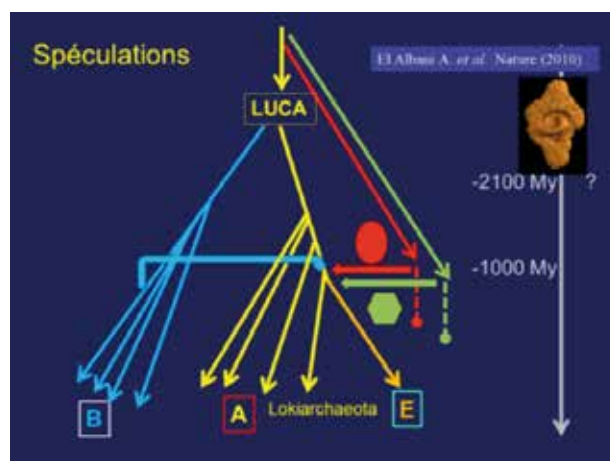
Le scénario que nous proposons est le suivant : bien avant LUCA, existait un monde proto-cellulaire se livrant une féroce compétition pour les ressources offertes



par la soupe prébiotique chacun avec son métabolisme (sa biochimie), ses stratégies de colonisations de différents environnements, ses capacités de collaborations, ses modes d'expansion et de réplifications, ses capacités d'optimisation et d'évolution. La plupart de ses lignées proto-cellulaires ont été éliminées sans laisser de trace. Mais certaines ont pu trouver comme ultime solution à leur survie de devenir des parasites de bactéries, archaebactéries et eucaryotes que nous connaissons aujourd'hui.

Dans ce cadre conceptuel, les virus pourraient être les héritiers des proto-cellulaires avortés, témoignant par leurs protéines et leurs gènes sans homologue de processus métaboliques et répliatifs non sélectionnés au cours de l'évolution des domaines cellulaires, mais largement adaptés aux parasites absolus qu'ils sont devenus, non sans contribuer à l'évolution de leurs hôtes.

A tous ceux qui trouveraient qu'une hypothèse aussi hasardeuse est incompatible avec nos connaissances scientifiques sur l'émergence de la vie sur terre, nous aimons rappeler que Monsieur El Alabani (Poitiers) et ses collègues ont suggéré l'existence d'organismes multicellulaires (pré-métazoaires) il y a plus de 2,1 milliards d'années (à partir de l'analyse de fossiles indiscutables), alors que nous pensions établi qu'une évolution évolutive datait tout au plus de 800 million d'années. Clairement la marge d'erreur des théories en vigueur sur l'origine de la vie reste suffisamment grande pour que beaucoup d'audaces soient encore permises.



De multiples questions sont en suspens :

- Origine unique ou multiple des virus ? Les petits virus ont-ils la même origine que les plus gros et ont-ils été juste une réduction de virus géants ?
- Quel est le mode d'évolution des virus (réduction ou augmentation) ?
- Autres types intermédiaires entre virus et cellules réduites ?
- Les virus/parasites sont-ils vivants ?
- Quelle est l'étendue de la diversité qui reste à découvrir ?
- Quelles sont les limites du monde viral (taille, complexité génomique)?
- Existe-il des métabolismes alternatifs ?
- Quelle est l'étendue du rôle écologique des virus?
- Le pergélisol recèle-t-il des menaces microbiologiques?

Parmi l'équipe importante qui travaille sur ce thème, je veux rendre un hommage particulier à Chantal ABERGEL, directrice de recherche au CNRS, co-directrice du laboratoire et responsable du groupe expérimental. Elle est lauréate d'une médaille d'argent du CNRS (2014) et de multiples autres distinctions. Sans elle, aucun des travaux que j'ai présentés n'auraient été réalisés.

(Applaudissements)

Les virus géants : histoire et conséquences d'une découverte non programmée



Jean-Pierre DECOR.- Merci pour cette introduction passionnante dans le Monde des virus. Beaucoup reste encore à découvrir en Biologie fondamentale.

L'exposé a été très clair, néanmoins nous allons prendre une ou deux questions de compréhension.

Maxime SCHWARTZ.- Quelle est la spécificité d'hôte de ces virus ?

Jean-Michel CLAVERIE.- En laboratoire, nous ne travaillons que sur *Acanthamoeba*. Nous utilisons cette amibe tant qu'elle nous ouvre des perspectives de découverte aussi rapides. Il est évident que cette diversité pourrait être différente si nous utilisions d'autres protistes. *Acanthamoeba* est la cellule de protiste la plus facile à cultiver en laboratoire.

Dès que nous avons un nouveau virus, nous vérifions qu'il n'est pas capable d'infecter des cellules humaines ou des cellules de souris. Nous utilisons des macrophages pour vérifier qu'il n'y a pas de cycle productif de virus dans ces systèmes.

Nicole LE DOUARIN.- Les parties du DNA qui ne sont pas assimilables sont très différentes de celles des organismes que nous connaissons déjà. Quelles sont leurs caractéristiques ? Le code génétique est-il le même ?

Jean-Michel CLAVERIE.- Concernant le code ; c'est la première question que nous nous sommes posé quand nous avons eu ce type de problème : Fort heureusement, il existe la protéomique. Avec ces 300 protéines

de virus, nous avons pu vérifier qu'elles sont bien codées par le code génétique classique. Ce sont des protéines parfaitement normales sauf qu'elles sont d'une origine totalement différente de celles connues actuellement.

Nicole LE DOUARIN.- Il faudrait mettre LUCA plus haut.

Jean-Michel CLAVERIE.- Nous avons aussi un problème de barrière épistémologique : l'homme veut toujours voir une unique cause pour toute chose. Il resterait à démontrer que la vie sur terre n'a qu'une seule origine.

Nous avons des collaborations avec la NASA. Il y a de nouveau une résurgence de cette idée de panspermie, cela redevient une théorie scientifique : sur terre, des formes de vie n'auraient pas encore été découvertes. Il existe de vrais travaux scientifiques réalisés par la NASA et d'autres fondations pour rechercher sur terre l'existence de vie qui ne serait pas aussi habituelle que celle connue actuellement dans le monde cellulaire.

Jean-Pierre DECOR.- Merci pour ces précisions, Nous allons poursuivre avec la deuxième conférence. Elle va nous conduire dans un autre domaine : la compétition que se livrent virus et bactéries avec les applications possibles que l'on peut en attendre.



Dr Laurent DEBARBIEUX
Département de
Microbiologie, Institut
Pasteur Paris

Dr Jean-Pierre DECOR.- Laurent DEBARBIEUX est chef du projet IBBA (Interactions bactériophages-bactéries chez l'animal) dans le département de microbiologie de l'Institut Pasteur.

Après sa thèse à l'université de Lille, il a effectué un stage post doctoral à Harvard Medical School. Recruté comme chargé de recherches à l'Institut Pasteur de Paris en 2002, il s'est rapidement intéressé aux interactions phages/bactéries.

Il est membre fondateur de PHAGE : Phages for Human Applications Group Europe.

En 2014, il a été élu président de la Société Internationale des Virus de Microbes.

Avec lui nous allons découvrir les relations complexes entre les virus et les bactéries, faites d'attaques et de contre-attaques. Ces connaissances ont permis des applications très intéressantes en transgénése. Elles remettent aussi au goût du jour la devise : « les antibiotiques, ce n'est pas systématique ».

Dr Laurent DEBARBIEUX.- Merci pour cette introduction et cette opportunité de parler du travail que nous réalisons à l'Institut Pasteur sur les bactériophages et leurs applications en médecine.

Les bactériophages ont été découverts en 1917. L'année prochaine nous célébrerons les 100 ans de la publication de Félix d'HERELLE. C'est un article extrêmement court très différent de ceux d'aujourd'hui : une seule page.

Il est écrit : « *Des selles de divers sujets convalescents de dysenterie bacillaire, et dans un cas de l'urine, j'ai isolé un microbe invisible doué de propriétés antagonistes*

vis-à-vis du bacille de Shiga ».

À travers cette première phrase, Félix d'HERELLE décrit la propriété antibactérienne d'un « microbe invisible ». Cela rejoint les définitions virales données par Jean-Michel CLAVERIE. Il s'agissait d'un virus qu'il a appelé bactériophage ayant infecté le bacille de Shiga.

En 1917, il faut se rappeler que les antibiotiques n'étaient pas encore découverts. Ceci constitue en fait le premier traitement antibactérien spécifique. Félix d'HERELLE a observé ce principe antagoniste chez les patients en voie de guérison de dysenterie bacillaire. Il a associé immédiatement la guérison de ces patients à la présence des bactériophages. Deux ans plus tard, il traitait les premiers enfants à l'hôpital Necker.

Ce premier traitement antibactérien a connu une expansion mondiale. Nous retrouvons des applications thérapeutiques aussi bien au Brésil, en Égypte, Géorgie, mais aussi en Europe et aux États-Unis, donc à travers la planète entière et cela pendant une vingtaine d'années, jusqu'à la découverte des antibiotiques.

Dès la découverte des antibiotiques, pendant la seconde guerre mondiale, la transition a été très rapide, les antibiotiques ont été alors employés de manière importante pour les bienfaits que nous connaissons.

La conséquence a été pour la phagothérapie (utilisation thérapeutique des bactériophages), un déclin de cette pratique médicale, à l'exception de quelques pays en Europe de l'Est où cette technique avait connu un développement très important.

Il était dû à un scientifique géorgien qui avait traversé l'Europe dans les années vingt pour rencontrer Félix d'HERELLE à l'Institut Pasteur et se familiariser avec les bactériophages. Retourné en Géorgie, il avait convaincu l'Union soviétique de Staline de construire un institut dédié à la recherche sur les bactériophages et à leurs applications thérapeutiques.

Cet institut existe encore aujourd'hui dans

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

lequel, depuis bientôt 100 ans, on traite des patients avec des bactériophages contre des infections bactériennes.

Il existe cette dichotomie entre un monde occidental qui a un peu oublié cet aspect thérapeutique et quelques pays qui l'ont préservé. A l'apogée de l'Union soviétique, dans les années 1950/1960, dans toute sa zone d'influence, l'emploi des bactériophages était généralisé. Les sites de production fournissaient des millions de quintaux de bactériophages. Tout le monde y avait accès.

Après l'effondrement du bloc soviétique, seuls quelques sites subsistent, localisés, en Géorgie et en Pologne.

Quelles sont les raisons de ce déclin de la phagothérapie ?

Le facteur principal a été la découverte des antibiotiques.

Une deuxième raison est la méconnaissance de ces bactériophages.

Ce n'est que dans les années quarante, grâce à l'utilisation du microscope électronique, qu'on a pu réellement voir ces premiers virus et clore le débat sur la nature des bactériophages : s'agissait-il de virus ou

d'enzymes ?

Ce débat a été vif et il a fallu une vingtaine d'années avant de pouvoir classer définitivement les bactériophages dans le monde des virus. Comme tout virus on peut les définir comme étant composé d'une structure protéique protégeant un acide nucléique et depuis leur découverte il en a été décrit de nombreuses familles.

Après le déclin de l'application thérapeutique, les bactériophages ont continué à être utilisés pour développer des connaissances moléculaires fondamentales sur les interactions virus -organismes cellulaires.

Comme cela a été mentionné précédemment il y a beaucoup de virus sur la planète. L'image d'un verre d'eau avec une planète à l'intérieur est prise pour donner un ordre de grandeur. On estime que dans ce verre d'eau de mer, on trouve autant de bactériophages que d'humains sur terre !

A côté de toute cette diversité, il y a un biais d'échantillonnage énorme, puisque 96 % des bactériophages décrits jusqu'à présent appartiennent à la famille des Caudovirales.

Bactériophage = virus infectant une bactérie

Définition: une structure protéique protégeant un acide nucléique

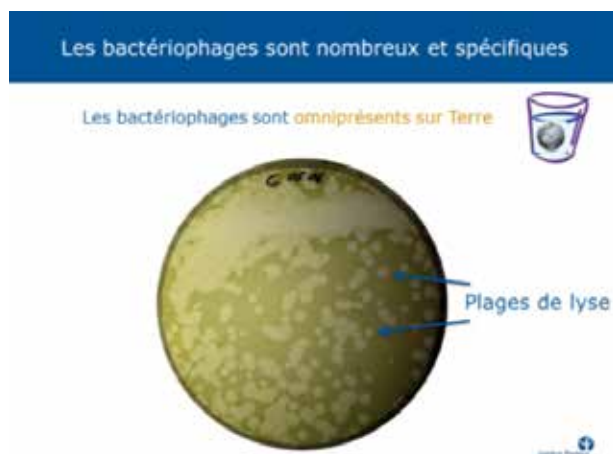
96% des bactériophages appartiennent à la famille des Caudovirales

Institut Pasteur



Le modèle classique étudié en biologie depuis 50 ans est le bactériophage T4 qui infecte une bactérie bien connue : *Escherichia coli*. Au laboratoire, pour isoler ces bactériophages, nous utilisons des techniques identiques à celles décrites par Félix d'HERELLE dans son article initial : une boîte de Pétri, qui sert de milieu nutritif aux bactéries.

Les bactéries déposées se multiplient et forment une couche jaune opaque à la surface de la boîte nutritive. Les plages claires (plages de lyse) sont issues de l'action du bactériophage.



Le processus est le suivant : lorsqu'un bactériophage infecte une bactérie, il génère de nouveaux bactériophages qui vont infecter les bactéries environnantes. Par multiplication un grand nombre de fois, cette attaque finit par détruire toutes les bactéries situées dans l'environnement proche provoquant l'apparition d'une zone claire dans laquelle il n'y a plus de bactérie, mais des millions de bactériophages...

Les bactériophages sont nombreux mais très spécifiques. C'est un point important à bien comprendre.

Pour cela on peut réaliser une expérience très classique avec huit bactériophages différents, tous capables d'infecter une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Par dilutions successives, on observe que les bactériophages sont capables d'infecter correctement cette souche. Si nous prenons quatre autres souches

différentes de *Pseudomonas aeruginosa*, une seule est effectivement bien lysée, mais moins efficacement que la souche précédente. Parmi les trois autres, deux sont complètement résistantes et pour la troisième seulement trois bactériophages sont actifs sur les huit testés.

Cette spécificité extrêmement importante doit être bien gardée en mémoire pour envisager l'utilisation thérapeutique des bactériophages.

La question qui vient alors à l'esprit est la suivante:

Comment se fait-il qu'il y ait encore des bactéries sur notre planète s'il existe une prédation virale si importante ?

La raison en est simple : les deux espèces coévoluent dans un système qui ne cherche pas la destruction totale de l'autre, mais vise les populations majoritaires.

Le cycle peut être schématisé de la façon suivante :

Soit une niche écologique dans laquelle une bactérie va pouvoir se développer. Elle augmente ainsi la probabilité de rencontrer un bactériophage capable de l'infecter. Lorsque la rencontre a lieu, le bactériophage va décimer la population de cette bactérie en augmentant sa propre population. La niche écologique va être libérée pour qu'une autre bactérie puisse l'occuper. Cette nouvelle bactérie à ce moment-là va se multiplier offrant l'opportunité à un autre bactériophage de l'infecter et ainsi de suite.

Cette coévolution dynamique repose sur des mécanismes moléculaires très bien étudiés d'infection des bactéries par les bactériophages.

La première étape essentielle est celle de reconnaissance et d'absorption du bactériophage à la surface de la bactérie lui permettant d'injecter son matériel génétique à l'intérieur du cytoplasme de la bactérie.

A ce stade se situent deux possibilités suivant la nature même du bactériophage :

S'il s'agit d'un bactériophage virulent, il

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

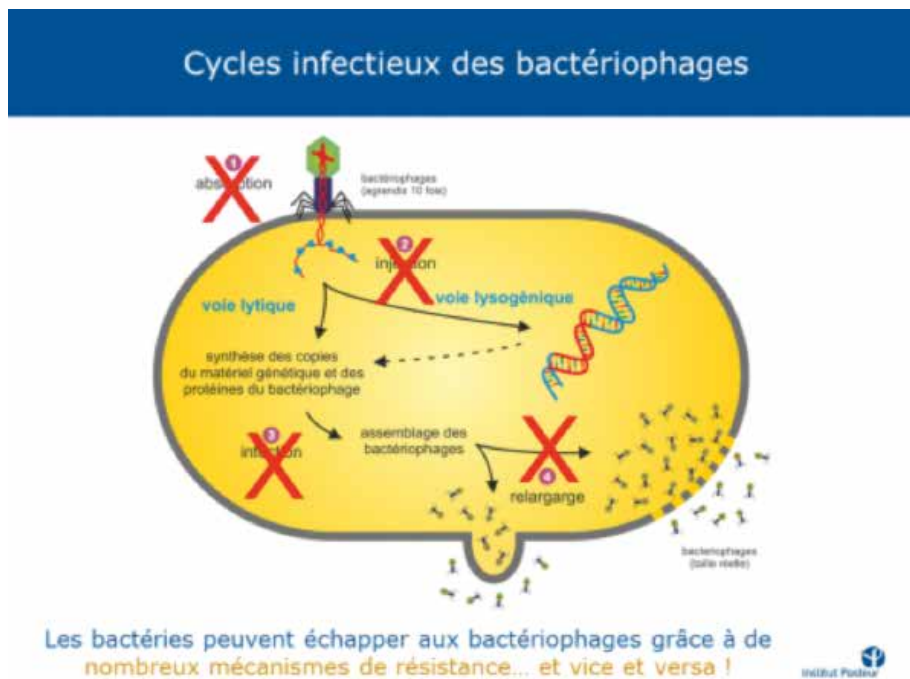
est capable d'infecter la bactérie, de se reproduire et de la détruire avec formation de nouveaux virions (plusieurs centaines par bactérie), suivi de leur relargage dans l'environnement.

Soit vous avez affaire à un bactériophage tempéré qui, au lieu de suivre ce cycle d'infection virulent, aura la possibilité d'avoir une voie lysogénique, à savoir de ne pas immédiatement démarrer l'infection de la bactérie, mais d'aller cacher son matériel génétique dans le chromosome de la bactérie et rester ainsi quasi-silencieux dans le génome bactérien. La bactérie n'est pas détruite. Elle continue à se multiplier et porte en elle ce bactériophage appelé un prophage. Aujourd'hui, par les méthodes de séquençage à haut débit accessibles, il a été possible de séquencer des milliers de génomes de bactéries. Nous nous

sommes aperçus que quasiment toutes les bactéries possèdent dans leur génome un, voire plusieurs prophages. Une analyse poussée, a permis de conclure que plus de 30 à 40 % du génome bactérien est issu de précédentes infections virales identifiées par ces prophages insérés. Dans le génome bactérien ils ont la possibilité de ressortir et de reprendre un cycle d'infection virale en infectant de nouvelles bactéries.

Face à ces attaques et à cette prédation virale, les bactéries ont développé différents systèmes de résistance pour pouvoir coévoluer. La résistance peut se manifester à différents niveaux : au niveau de l'absorption, de l'injection du matériel génétique, de la réplication ou de la sortie des bactériophages. À chaque étape, il existe la possibilité pour la bactérie de lutter contre le bactériophage.

Toutes les bactéries en se multipliant



produisent un taux d'erreurs légèrement faible qui assure la diversité des populations bactériennes et contribue à l'évolution. Le bactériophage en se répliquant dans la bactérie utilise le même principe pour créer des variations.

Les populations virales « relarguées » lors d'un cycle infectieux ne seront donc pas

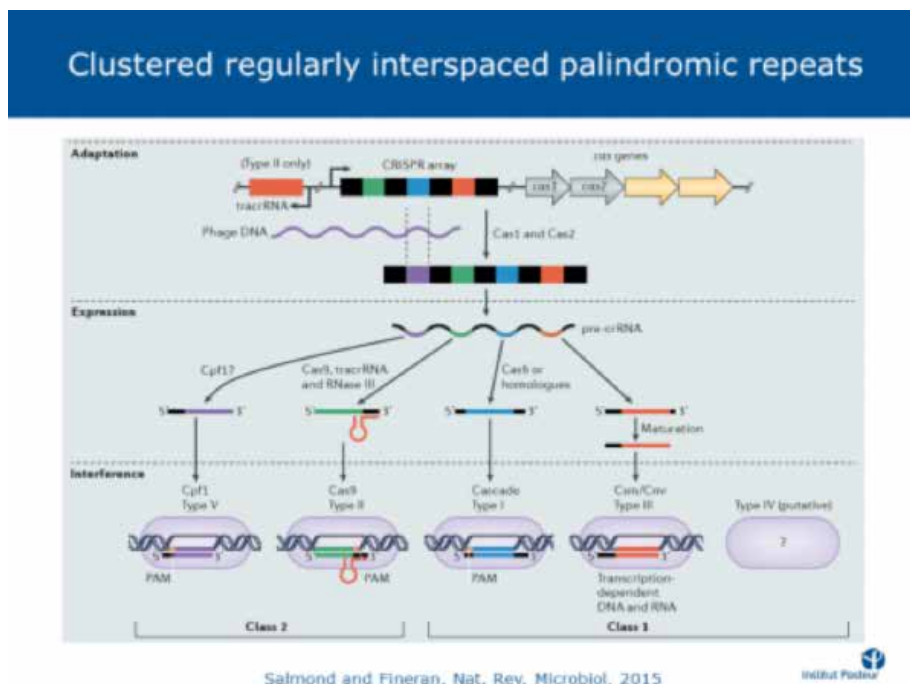
homogènes à 100 %, mais quasi-homogènes. Cette évolution va générer des variantes de bactériophages qui vont pouvoir s'adapter aux mécanismes de résistance produits par les bactéries.

Ce jeu évolutif entre les bactéries et les bactériophages a lieu depuis des millénaires et se poursuivra bien longtemps.



Parmi ces systèmes de résistance, un nouveau a été découvert il y a une dizaine d'années : le système CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Il résulte du séquençage des génomes bactériens.

Il a été identifié des régions très spécifiques avec des séquences répétées absolument identiques symbolisées sur le schéma par des boîtes noires. Entre ces séquences répétées, il existe des séquences variables représentées par les boîtes de couleur.



Ces boîtes de couleurs correspondent à des petits fragments génomiques de bactériophages. En fait, la bactérie, dans son génome, a gardé la mémoire d'une infection phagique précédente. Elle va utiliser cela, comme le système immunitaire chez l'homme qui a une mémoire des événements passés, pour contrecarrer une nouvelle infection virale.

Tout bactériophage sera dans l'impossibilité d'infecter une bactérie à partir du moment où il présentera une homologie très forte avec une de ces boîtes de couleur. Les CRISPR se mettent en place pour combattre cette infection bactérienne et agissent comme une sorte de vaccin.

Les CRISPR ont fait l'objet d'une étude intense. Il en ressort une classification en deux grandes classes et différents types. Cette recherche est encore en cours, mais, un cas exceptionnel est devenu emblématique de

la vitesse avec laquelle une découverte peut être transformée en outil biotechnologique.

C'est le cas du type 2 qui repose sur l'utilisation d'une protéine appelée Cas 9. Comme pour n'importe quel gène, chaque séquence CRISPR, qui contient donc de l'ADN viral, est transcrite en ARN qui est la séquence complémentaire de cet ADN. Mais plutôt que d'être traduit en protéines cet ARN va se lier à l'enzyme Cas 9. Ce redoutable attelage est capable de détecter la séquence d'ADN donnée, puis de la découper avec précision.

Plus généralement, on peut fabriquer au laboratoire un « ARN guide » correspondant au gène que l'on souhaite cibler. Associé à une enzyme Cas 9, il va lui permettre de découper le gène au nucléotide près ! C'est précisément ce qu'Emmanuelle Charpentier réussit à faire in vitro en 2012.

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

On s'est ensuite rapidement aperçu que l'on pouvait utiliser cette protéine Cas 9 dans différents types cellulaires, pas seulement chez les bactéries, mais bien évidemment chez les eucaryotes.

Des expériences ont été effectuées pour détruire des gènes cibles dans les plantes, les poissons, les souris.

La technique a pu être légèrement modifiée pour que la Cas 9 ne coupe pas le gène cible, mais stimule son expression, l'inhibe ou le remplace par un autre...

Sur toute la planète, il y a une explosion de start-up développées pour utiliser cet outil et proposer des modifications génétiques.

Cela pose des problèmes éthiques. Il est possible techniquement aujourd'hui d'éditer le génome humain et de faire un nouveau mutant ou de corriger une déficience génétique à l'aide de ces outils.

Au niveau des publications, on peut noter l'engouement de cette enzyme : découverte en 2010/2011 avec un ou deux articles par an ; l'année dernière, il y a eu plus de 800 articles consacrés à cette protéine.

En l'absence de nouveaux antibactériens, pourquoi ne pas essayer de lutter contre les bactéries d'une nouvelle manière ?

Nous sommes en fait au bout du rouleau par rapport à l'utilisation des antibiotiques. Ils sont encore largement utilisés aujourd'hui, mais nous réalisons que nous sommes dans une situation problématique. Cela a été très bien illustré par le rapport de l'OMS publié en mars 2014 selon lequel la résistance aux antibiotiques n'est pas un problème futur, mais bien actuel et concerne la planète entière. Nous sommes face à des impasses thérapeutiques de plus en plus importantes. Si nous ne pouvons pas résoudre ce problème, nous nous dirigeons vers un monde où les infections communes contrôlées avec les antibiotiques au milieu des années 1940/1950 vont refaire surface et créer des problèmes de plus en plus importants.

Depuis 20/30 ans, nous n'avons pas

découvert de nouvelle molécule majeure en termes de capacité antibiotique.

Aussi nous avons entrepris de rechercher d'autres solutions :

Au laboratoire nous nous sommes intéressés à la proposition de Félix d'HERELLE d'utiliser des bactériophages.

Concernant l'abondance des bactériophages dans l'environnement, c'est plutôt l'eau de mer qui est la source la plus riche. Félix d'HERELLE a trouvé ces premiers bactériophages dans les selles de patients. En effet notre intestin foisonne de bactéries mais aussi de bactériophages.

Ce sont les eaux d'égout qui contiennent le plus de bactériophages capables d'infecter les bactéries qui nous intéressent.

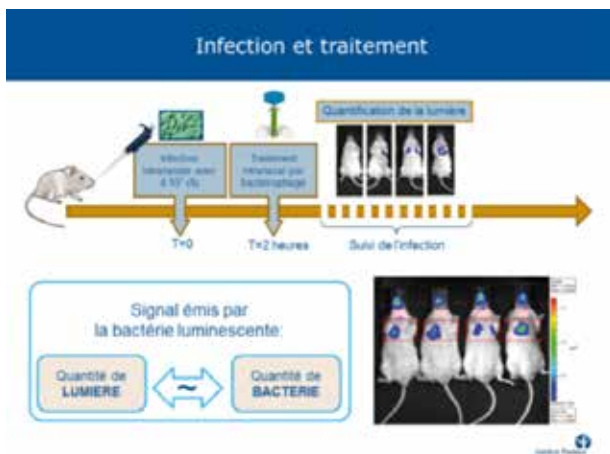
Avant de pouvoir prendre un bactériophage et l'utiliser dans un modèle animal, il est nécessaire de le caractériser et pour cela il doit être préalablement purifié.

Nous avons choisi le cas d'une infection pulmonaire aigüe chez la souris. En 48 heures, les animaux décèdent. Après un traitement par les bactériophages, la réponse est dose dépendante : plus la quantité de bactériophages utilisés est importante, plus le taux de survie augmente et peut aller jusqu'à 100 %, donc une guérison totale des animaux.

La cinétique d'infection d'un bactériophage sur une bactérie est rapide. En milieu optimum *in vitro*, le cycle répliatif du bactériophage est inférieur à 15 minutes et peut produire plus de 300 nouveaux bactériophages. Cette vitesse de multiplication combinée au grand nombre de fois représente un grand avantage au niveau thérapeutique. A partir de la cellule infectée, les nouveaux bactériophages diffusent rapidement vers les bactéries environnantes. Il existe une auto-amplification du principe actif au site infectieux.



Des expériences de cinétique utilisant la technique de l'émission de bioluminescence illustrent bien ce résultat. La trace de la bactérie qui émet de la lumière est repérée sur les animaux endormis par des photos à intervalles réguliers. Après avoir, par application intranasale, introduit des bactéries pour initier une infection pulmonaire, une photo est prise après deux heures. Les animaux sont séparés en deux groupes : l'un non traité et l'autre auquel on administre des bactériophages. Deux heures plus tard, l'infection évolue. Quatre heures après, nous voyons déjà une nette différence entre les deux groupes. Les bactériophages en pleine action ont déjà tué la majorité des bactéries présentes dans les poumons des animaux.



Ces observations sont quantifiées au laboratoire : le nombre de bactéries, le nombre de bactériophages et les réponses inflammatoires.

Il se produit la cascade d'évènements suivant : les bactériophages ciblent les bactéries ; le nombre de bactéries va être réduit ; le nombre de bactériophages augmente (c'est le corollaire à l'infection par le virus) ; l'inflammation va être réduite puisque l'agent pathogène bactérien est éliminé et la survie va être augmentée.

Par observation histologique ou histochimique, les poumons murins infectés et traités présentent encore quelques traces d'infection, mais sont en période de rémission, beaucoup plus proche d'un terrain sain qu'infecté.

Ce résultat est tout à fait comparable à celui obtenu par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Fort de ces modèles animaux sur l'efficacité des bactériophages, nous avons examiné la possibilité d'utiliser les bactériophages directement en traitement clinique.

La première population de patients ciblés ont été des personnes atteintes de mucoviscidose. C'est une maladie génétique qui a pour conséquence l'encombrement des bronches par du mucus créant un terrain propice à l'infection bactérienne.

Ces patients décèdent d'ailleurs souvent d'infections pulmonaires bactériennes.

Ayant eu accès à des expectorations de ces patients, nous avons pu tester si les bactériophages étaient capables d'accéder aux bactéries présentes dans ce milieu muqueux et relativement complexe. Il contient entre autres des cellules de réponses immunitaires, des protéases pouvant éventuellement interférer avec la capacité des bactériophages à infecter les bactéries.

Dans ce protocole, après 6 heures de traitement en présence de bactériophages, la quantité de bactéries a été réduite d'au moins 2 unités logarithmiques. Cela signifie clairement que les bactériophages ont pu éliminer une partie des populations bactériennes présentes dans ces échantillons.

Après analyse complète de tous les échantillons, nous avons examiné l'augmentation du nombre de bactériophages. Connaissant la quantité de bactériophages initiale, toute augmentation correspond à l'activité d'au moins un bactériophage ayant infecté une bactérie. Les autres paramètres mesurés ont été la réduction des bactéries et la permissivité des colonies isolées dans les différentes expectorations.

En résumé, pour environ 50 % des échantillons des expectorations de patients, il y a une corrélation directe entre l'augmentation du nombre de bactériophages et la réduction du

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

nombre de bactéries, prouvant directement que les bactériophages ont bien été capables d'infecter les bactéries dans les expectorations de patients.

Nous avons essayé de corrélérer cette activité avec différents paramètres liés aux patients eux-mêmes : l'âge, le sexe, le type de mutation génétique, le traitement antibiotique. Aucun paramètre significatif n'est ressorti de cette analyse. Je vais dire de manière provocatrice : le bactériophage n'a cure du patient, il ne s'intéresse qu'à la bactérie !

Le développement de l'utilisation des bactériophages dans le traitement des infections pulmonaires a été poursuivi en collaboration avec des cliniciens de l'AP-HP.

Nous nous sommes intéressés aux pneumopathies qui se développent dans les services de réanimation. En région parisienne il y a une grande augmentation de la fréquence des pneumopathies dues à *Escherichia coli*. Cette bactérie pose de plus en plus de problème. Sa résistance aux antibiotiques est en train de croître de manière exponentielle entraînant de graves difficultés de traitement.

Au laboratoire, nous avons utilisé les mêmes outils d'infection pulmonaire avec une bactérie rendue luminescente pour suivre la cinétique. Nous avons obtenu le même type de résultats. Le médecin, membre de notre équipe, a voulu comparer l'efficacité d'un traitement bactériophage à celui de référence par antibiotiques. L'évolution cinétique du traitement par les bactériophages est absolument identique à celle avec l'antibiotique. La survie

obtenue dans ce modèle est aussi identique. Nous avons bien une efficacité équivalente entre bactériophages et antibiotiques dans ce modèle.

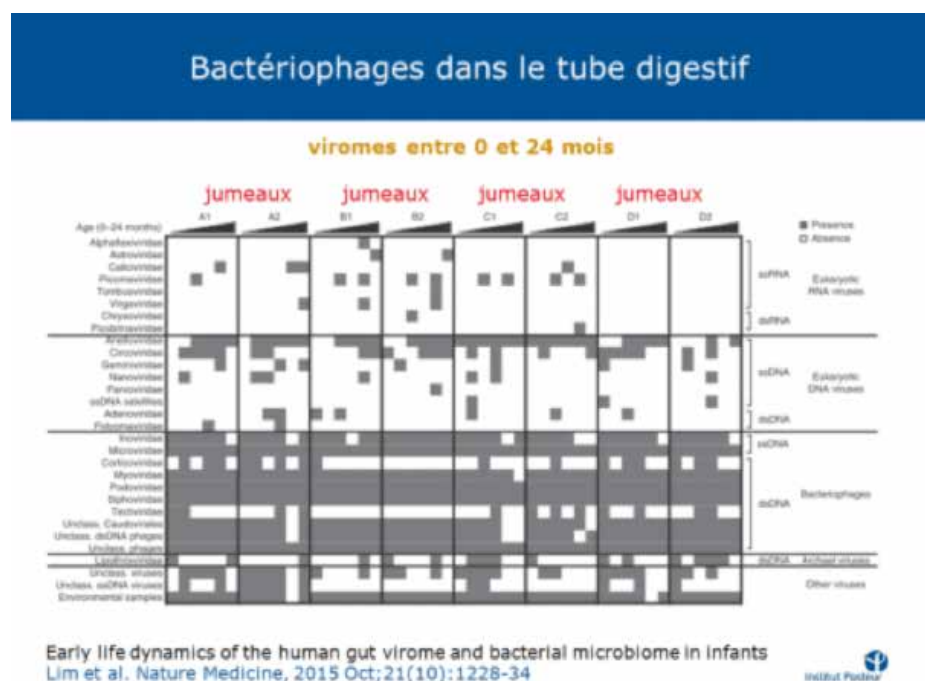
En résumé, à travers les modèles d'infection pulmonaire, les bactériophages sont efficaces pour des traitements curatifs d'attaques extrêmement importantes.

Nous avons ensuite voulu examiner l'activité des bactériophages au niveau de l'intestin

Cet organe est un immense réservoir de bactériophages et de bactéries.

Le but de nos expériences est d'essayer de comprendre comment ces deux espèces antagonistes peuvent coexister. Quelles sont leurs interactions et leurs conséquences ?

Quelques données métagénomiques ont été publiées, relatives à la partie virale analysée par séquençage sur de jeunes enfants entre 0 et 24 mois. Au cours de ces deux premières années nous avons suivi l'évolution des populations virales.





Tout ce qui est gris foncé représente les populations virales identifiées avec en haut du tableau les virus eucaryotes et dans le bas les bactériophages. Dans nos intestins, nous avons donc beaucoup plus de bactériophages que de virus qui infectent des cellules eucaryotes.

La diversité et la richesse de ces bactériophages diminue d'une manière surprenante au cours des deux premières années. Nous ne nous attendions pas à ce que cette variation soit aussi importante sur une échelle de temps aussi courte.

Le corollaire de cette diminution de richesse et de diversité des bactériophages devrait correspondre aussi à une réduction de la richesse et de la diversité des bactéries. En effet, jusqu'à présent, le postulat relativement simpliste est qu'à une plus grande diversité bactérienne correspond une plus grande diversité en bactériophages.

En fait, nous avons observé l'inverse : beaucoup de bactériophages et très peu de bactéries à la naissance ; deux ans plus tard, beaucoup moins de bactériophages et beaucoup plus de bactéries...

Nous n'avons absolument aucune idée de la raison de cette variation sur une échelle de temps relativement courte ; les deux premières années de vie.

Ceci est à mettre en parallèle avec une autre étude réalisée chez des adultes, atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, notamment la maladie de Crohn.

Par comparaison avec des sujets sains ayant une population de bactériophages relativement modérée, en correspondance avec une population bactérienne assez diverse, chez les patients atteints de ces maladies inflammatoires de l'intestin, la situation est déséquilibrée avec une augmentation extrêmement importante du nombre et de la diversité des bactériophages et une réduction du nombre et de la diversité des bactéries. C'est la même situation que pour les enfants à la naissance.

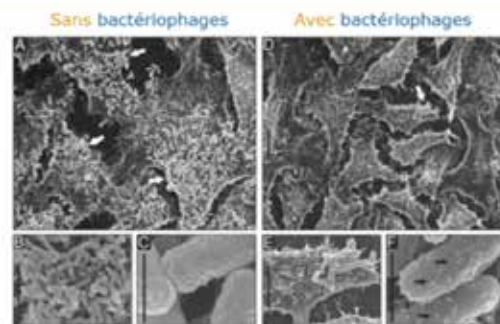
Il existe une dynamique entre les populations

virales et les populations bactériennes dans l'intestin que nous sommes loin d'avoir compris.

Pour essayer d'apporter quelques éléments de compréhension, au laboratoire, nous développons des modèles d'interaction entre les phages et les bactéries dans l'intestin des souris. En préliminaire, nous sélectionnons *in vitro* des bactériophages présentant différentes capacités à infecter des biofilms c'est-à-dire des communautés de bactéries associées les unes aux autres.

Il est à noter que la population bactérienne dans l'environnement vit la plupart du temps sous forme de biofilms, plutôt que sous forme planctonique.

Réduction des biofilms formés sur des cellules *in vitro*

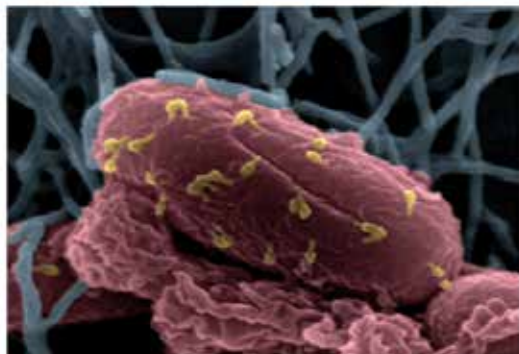


Sur ces images, à gauche, sont représentées des cellules eucaryotes tapissées par la bactérie capable de recouvrir et d'adhérer à ces cellules épithéliales pour former des amas. A droite, tous ces amas bactériens ont été disséminés par l'attaque des bactériophages. À l'extrême droite, en bas, la surface de bactéries avec des bactériophages.

L'image suivante représente l'attaque de plusieurs dizaines de bactériophages en train de tuer une bactérie.

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

Réduction des biofilms formés sur des cellules *in vitro*



Scanning Electron Microscopy of the B2001 cell from EPEC (EPEC) from the University of California, San Diego

Après ces caractérisations *in vitro*, une étude *in vivo* chez les modèles murins a été initiée. Des bactériophages ont été ajoutés dans l'eau de boisson d'un lot de souris. Plus la dose de bactériophages est augmentée dans l'eau de boisson plus le nombre de bactéries ciblées diminue dans l'intestin.

Après avoir arrêté la prédation par les bactériophages, trois jours plus tard, le nombre de bactéries est identique à celui du lot témoin non traité. Ceci s'explique par le fait que les bactériophages ne peuvent que s'accrocher aux bactéries et non aux cellules eucaryotes. Les bactériophages ne reconnaissent pas autre chose que les bactéries. Le flux digestif élimine les bactériophages s'ils ne sont pas capables de se renouveler et de se maintenir dans l'intestin.

Nous avons mis en place un deuxième modèle en relation avec des bactéries uropathogènes, hébergées dans l'intestin de l'homme qui causent des infections urinaires dans la population. Elles sont silencieuses et attendent le moment propice pour développer ce type d'infection.

Dans un modèle animal de portage bactérien, nous avons pu mettre en évidence, qu'une seule addition de bactériophages au septième jour de l'infection, permettait de décroître au cours du temps la quantité de bactéries ciblées. Dans cette expérience, les phages sont capables de s'auto-amplifier dans l'intestin et de petit à petit gagner la bataille contre les bactéries. Cela finit par diminuer

d'au moins deux unités logarithmiques la quantité de bactéries dans l'intestin.

Enfin, il est important d'examiner la coévolution au cours du temps de ces deux entités antagonistes, les bactériophages et les bactéries.

L'une des questions pour une application thérapeutique concerne les conséquences possibles du système que l'on a initié. En effet, lorsqu'on ajoute des bactériophages à une population bactérienne, on ne peut pas, contrairement aux antibiotiques arrêter le traitement, on est en présence d'un système biologique dynamique.

Quelles peuvent être les effets secondaires de l'évolution d'un bactériophage ?

Pour cela, dans un modèle murin, nous avons créé un système comportant deux bactéries, l'une commensale et l'autre pathogène auquel nous avons ajouté un bactériophage capable de cibler la bactérie pathogène. Le but de cette expérience est d'examiner si, au cours du temps, le bactériophage pouvait évoluer et infecter la bactérie commensale.

C'est ce qui se produit bien mais assez lentement au bout de deux semaines chez l'animal ; mais n'est jamais observé lorsqu'on effectue ces mêmes expériences dans un tube à essai.

Ces mécanismes moléculaires sous-jacents à ces coévolutions vont être étudiés pour mieux comprendre les conditions de passage d'un bactériophage d'une espèce de bactérie à l'autre.

Pour terminer, quelques éléments sur les perspectives thérapeutiques de la phagothérapie. Une étude clinique, financée par l'Europe, vient de débuter sur des grands brûlés pour traiter les infections cutanées résistantes aux antibiotiques. Les patients ont été recrutés depuis quelques mois. Les résultats pourraient être disponibles dans un ou deux ans.

Cette étude est délicate à mettre en place sur le plan réglementaire. Les bactériophages ne faisant pas partie de la pharmacopée



habituelle ; ce ne sont ni des molécules chimiques, ni des anticorps. Comme l'a précisé Jean Michel CLAVERIE, un virus est un virus. C'est plus difficile à appréhender en termes réglementaires.

La phagothérapie sera spécifique, éventuellement modifiable et personnalisée en s'intéressant essentiellement à la bactérie du patient. C'est un concept que l'industrie pharmaceutique n'a pas encore appréhendé. Quand on parle de médecine personnalisée, il s'agit de prendre en compte des groupes de patients alors qu'ici nous prenons en compte la bactérie de chaque patient.

Plusieurs start-up émergent. Les grandes entreprises pharmaceutiques ne sont pas prêtes à investir. Faut-il une incitation politique pour créer un centre national de référence apportant des soutiens scientifiques à cette approche thérapeutique ?

Il fait peu de doute, qu'à terme, nous aurons recours aux bactériophages. La liste d'attente des patients sans solution antibiotique continue de s'allonger!

La résistance aux antibiotiques pose un problème croissant et le potentiel des bactériophages est bien réel. Il ne faut pas attendre indéfiniment pour l'utiliser et permettre à certains patients d'en bénéficier. L'homme et les bactériophages c'est une histoire à écrire. La première page a été initiée par Felix d'HERELLE et toute la recherche qui en découle aujourd'hui permettra d'en écrire de nouvelles avec, je l'espère, une fin heureuse affirmant que les bactériophages sont de retour en médecine.

En conclusion je remercie les différentes personnes qui collaborent à ces recherches et les différents supports financiers qui nous soutiennent.

Interactions Bactériophages Bactéries chez l'Animal

Lhoussaine Touqui (I. Pasteur)
Rob Ladhoe (K.U. Leuven)
Angus Bucking (Univ. Exeter)
James Di Santo (I. Pasteur)
Spencer Shorte (I. Pasteur)
Isabelle Sermet-Gaudelus (H. Necker)
Jean-Damien Ricard (H. L. Moirat)
Erick Denamur (H. Bichat)
Raphael Chiron (H. Montpeller)
Stephen Lory (Harvard Medical School)
Guy Schoelle (IBS Grenoble)
Ramesh Wigneshwaran (Imperial College)

Anne CHEVALLEREAU (PhD)
Luiza Di SORDI (Post-doc)
Nicolas DUFOUR (MD-PhD)
Marta MANSOS LOURENCO
Dwayne ROACH (Post-doc)

Microviscose
Digest Sciences
FONDATION EDF
ASSOCIATION PUBLIQUE HORTAUX DE PARIS
Microbiologie

research.pasteur.fr/en/team/group-laurent-debarbieux

Je vous remercie de votre attention.

(Applaudissements)

Jean-Pierre DECOR.- Je vous remercie pour cette présentation remarquable.

Une question me brûle les lèvres. Vous avez opposé les antibiotiques aux bactériophages. Ils me sembleraient plutôt complémentaires. Peut-on envisager une association pour être plus efficace ?

Laurent DEBARBIEUX.- Ils ne sont pas en opposition mais sur deux schémas différents. Bien sûr qu'il faut les associer. Aujourd'hui, nous n'avons pas le choix, nous n'allons pas arrêter l'antibiothérapie, c'est tout à fait exclu. Si on met en place une approche par les bactériophages, cette coexistence sera nécessaire. Peut-être n'ira-t-on jamais plus loin que cette coexistence parce qu'on ne réussira pas à être totalement efficace avec les bactériophages seuls

Jean-François BACH.- J'étais particulièrement intéressé par vos résultats chez le nouveau-né. Les bactéries commensales, au moins chez la souris et chez l'homme dans une certaine mesure, qui colonisent l'intestin à la naissance viennent au départ de la mère pour l'essentiel.

Des arguments permettent-ils également de penser que les bactériophages apparaissant très tôt viendraient aussi de la mère ?

Par ailleurs, les bactériophages auront-ils le même effet pour des greffes de microbiote qui sont maintenant courantes ? Peut-on noter une différence d'effet sur un microbiote greffé par rapport à un microbiome initial ?

Bactériophages : de la médecine au fondamental et vice versa

Laurent DEBARBIEUX.- En effet, nous pensons que les bactériophages qui sont présents chez les nouveau-nés viennent en partie de la mère. Nous n'avons pas de démonstration. Il n'y a pas eu dans la même étude une analyse des particules virales issues de la mère. Mais des chercheurs travaillent aujourd'hui sur cette question et nous aurons la réponse d'ici peu.

La question concernant le microbiote et la transplantation fécale est très importante. Si elle ne pose pas de problème en médecine avec les bienfaits que l'on connaît, on sait parfaitement que les transplants contiennent de nombreux bactériophages. On n'a pas purifié les flores que l'on transmet aux individus. D'un point de vue réglementaire, on a totalement ignoré l'effet que pourraient avoir ces bactériophages.

Dans l'essai clinique en cours pour les grands brûlés, la réglementation a décidé de mettre un niveau de sécurité très élevé sur la pureté des bactériophages avec un impact financier important sur cet essai clinique. De l'autre côté, les transplantations fécales se pratiquent avec des milliers de bactériophages dont on ne connaît pas l'interaction ni les conséquences.

Nous sommes face une dualité assez surprenante. Quand on veut purifier le principe actif, on est sur une stratégie classique de purification ultime et, de l'autre côté, pour un phénomène global, on le sécurise au mieux sans aller au maximum de la sécurité parce que ce n'est pas possible. On l'utilise pour le bienfait des patients. Nous avons cette dualité et il faut arriver à la résoudre.

Jean-Pierre DECOR.- Il y a même intérêt à ne pas trop purifier car pour éviter les résistances, il faut peut-être avoir un cocktail de bactériophages.

Laurent DEBARBIEUX.- Effectivement, le bactériophage unique n'est pas une stratégie tenable. On est obligé d'obtenir des cocktails pour attaquer la bactérie sous plusieurs angles.

Maxime SCHWARTZ.- Félix d'Hérelle avait observé l'apparition des bactériophages au moment où le patient guérissait. Il en a

déduit que les bactériophages détruisaient les bactéries. Cela n'a pas été formellement démontré et beaucoup estiment que c'est la réaction immunitaire qui permet avant tout la guérison.

Pour les infections en surface comme pour les grands brûlés, on imagine assez facilement que les bactériophages puissent fonctionner.

La question est plus difficile quand il s'agit d'infections internes, au niveau de l'intestin, du poumon ou à l'intérieur d'autres organes. A-t-on des résultats d'essais cliniques du bactériophage pour des infections internes ?

Laurent DEBARBIEUX.- Le seul essai clinique réalisé selon les règles de l'art est l'essai en cours sur les grands brûlés. Il n'y en a nulle part ailleurs dans le monde. Nous en sommes vraiment au tout début.

Gérard ORTH.- Que se passe-t-il en Géorgie ?

Laurent DEBARBIEUX.- En Géorgie, les bactériophages sont admis et font partie du traitement classique. Il n'y a pas de nécessité à démontrer ce qui fonctionne pour eux. Selon les publications réalisées par ces différents scientifiques, aussi bien en Géorgie qu'en Russie, les taux de guérison atteignent 90 %. Cette littérature ne spécifie pas les contrôles préliminaires. Comment les collègues géorgiens manipulent-ils ces différents cocktails de bactériophages, cela reste assez flou.

En revanche, ces bactériophages ne sont pas produits de manière totalement empirique et quand nous les testons contre des souches cliniques en France ou aux États-Unis, ils ont un pouvoir assez étendu. Ils ont mis au point des solutions thérapeutiques qui, in vitro, sont très performantes. In vivo, si l'on doit s'en tenir aux résultats des essais cliniques réglementaires dans les règles de l'art des années 2010, il faudra attendre une dizaine d'années avant d'avoir le résultat de ces essais.

Nicole LE DOUARIN.- Vous parlez des bactériophages d'une manière générale.

A-t-on une idée de la spécificité des interactions entre un type de bactériophage et une bactérie particulière ?

Laurent DEBARBIEUX.- La spécificité tient à la reconnaissance entre un bactériophage et une bactérie. Cette reconnaissance



est extrêmement spécifique. Certains bactériophages vont reconnaître des structures extracellulaires, des protéines de membranes. Chaque bactériophage est une clé et il doit trouver sa serrure à la surface de la bactérie.

Mme Nicole LE DOUARIN.- En thérapie, on ne va pas injecter toutes sortes de bactériophages. Est-on capable d'avoir un type de bactériophage pour telle ou telle infection ?

Laurent DEBARBIEUX.- Un bactériophage ne va pas seul infecter toutes les souches *Escherichia coli*. On est obligé d'itérer un cocktail de bactériophages différents (5, 10, 15) et chacun d'entre eux aura un spectre complémentaire qui permettra de couvrir 70, 80 ou peut-être 90 % des souches auxquelles ils vont être confrontés.

Nous sommes sur une thérapie probabilistique. On va traiter 80 % des bactéries, mais il restera des patients pour lesquels cela ne fonctionnera pas.

Nicole LE DOUARIN.- Va-t-on injecter un ensemble de bactériophages à des patients qui ont des maladies très différentes ? Un même ensemble va-t-il être utilisé pour toutes sortes d'infections dont on connaît très bien les germes ?

Laurent DEBARBIEUX.- Il existe deux manières de voir les choses : les cocktails mono-spécifiques par exemple ciblant les *Escherichia coli* ou des cocktails à spectre large comme en Géorgie, avec des bactériophages capables d'infecter des *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, tout cela dans la même solution. Le principe est simple : seuls les bactériophages capables d'infecter l'agent infectieux vont se multiplier, les autres, ce n'est rien d'autre que les bactériophages que vous avez vous-mêmes dans votre intestin.

Jean-Pierre DECOR.- Nous allons suspendre cette discussion.

Nous pourrons la reprendre plus largement au cours de la table ronde ; veuillez bien garder en mémoire vos questions.

Laurent Debarbieux, encore merci pour cette présentation des bactériophages qui ouvre des perspectives intéressantes.

Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux



Dr Clément GILBERT

*Laboratoire Écologie et
Biologie des Interactions
Université de Poitiers et
CNRS*

Dr Jean-Pierre DECOR.- Après avoir étudié dans les universités de Poitiers et de Pierre et Marie Curie à Paris, Clément GILBERT a effectué une thèse à l'université de Stellenbosch en Afrique du Sud puis un stage postdoctoral à l'université d'Arlington au Texas. Il est ensuite retourné dans son université d'origine à Poitiers au Laboratoire d'Écologie et de Biologie des Interactions. Depuis, il est membre de nombreux comités relatifs à l'écologie. Il est l'auteur d'une trentaine de publications, notamment un article remarqué dans « Nature » consacré aux virus endogènes.

Le corps de l'homme abrite des milliards de virus. La proportion entre virus et bactéries est d'un pour 10. Comme le génome bactérien représente 10 fois notre génome, nous avons 100 fois plus de gènes de virus dans notre corps que nos propres gènes. Bien que de nombreux gènes de virus soient totalement inconnus, apparemment, cela se passe sans trop de dégâts.

Comment se fait-il que certains virus soient intégrés dans notre génome et que d'autres soient de redoutables pathogènes ? Clément GILBERT, pouvez-vous nous éclairer sur ce paradoxe ?

Dr Clément GILBERT.-

Merci pour cette introduction. Effectivement mon exposé traitera des transferts horizontaux de gènes entre virus et animaux. Les virus peuvent être considérés comme des symbiotes intracellulaires puisqu'ils ne peuvent se répliquer que lorsqu'ils sont à l'intérieur d'une cellule d'un de leurs hôtes. Lors de cette répllication, soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau des

cellules, les génomes viraux se retrouvent très proches des génomes de l'hôte et cela peut créer de nombreuses opportunités de recombinaisons, qu'elles soient accidentelles ou non.

Ces opportunités d'échanges de gènes entre hôtes et virus sont appelés transferts horizontaux, ils peuvent avoir lieu du virus vers l'hôte ou vice versa.

Les transferts horizontaux ont été étudiés depuis longtemps et de manière approfondie chez les organismes procaryotes. Comme cela a été illustré dans le précédent exposé, les bactériophages échangent de manière permanente leurs gènes avec ceux des bactéries. Ces transferts ont un impact sur l'évolution des bactéries mais également des bactériophages.

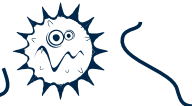
Les transferts chez d'autres organismes, comme les eucaryotes, ont été moins étudiés et sont moins bien connus. Ils vont faire l'objet de mon exposé.

Il sera divisé en deux parties suivant les deux directions que peuvent prendre ces transferts.

Dans la première partie, je présenterai quelques résultats récents concernant l'étude des virus endogènes de certains serpents. Je ferai également un point sur nos connaissances actuelles des virus endogènes chez l'homme, c'est-à-dire, ceux que nous avons intégrés dans notre génome.

Dans une deuxième partie, je parlerai des transferts horizontaux de l'hôte vers les virus en vous exposant quelques résultats de transferts de gènes de papillon vers les Baculovirus.

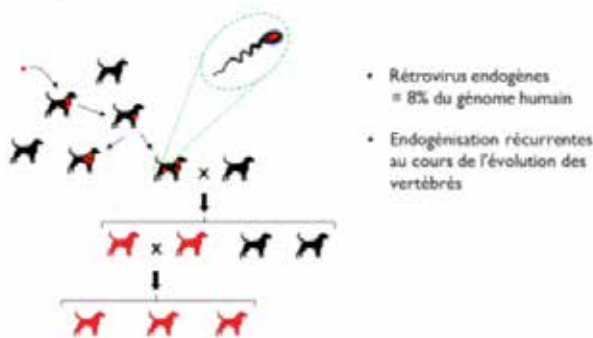
Les transferts de virus à hôte, nous savons qu'ils sont possibles depuis que l'on a découvert les rétrovirus endogènes à la fin des années 60. Ce sont des virus à ARN, de la famille Retroviridae. Ce sont les seuls qui ont la capacité d'intégrer leur génome de manière autonome et active dans celui de leurs hôtes. Cette intégration du génome viral est indispensable et nécessaire à la répllication



virale. Elle se produit généralement dans les cellules somatiques de l'hôte. Ces virus sont transmis de manière horizontale entre les différents individus d'une population hôte. Cependant, il peut arriver que certains puissent avoir accès à la lignée germinale. En l'infectant ils peuvent intégrer leur génome dans celui de certains gamètes. Si ces gamètes sont impliqués dans la formation de zygotes, les individus porteront ces copies de provirus dans toutes leurs cellules, qu'elles soient somatiques ou germinales et transmettront de manière verticale ces intégrations virales, si elles n'affectent pas le potentiel reproducteur de ces individus.

I. Transfert horizontal de virus à hôtes

- Eg. rétrovirus endogènes



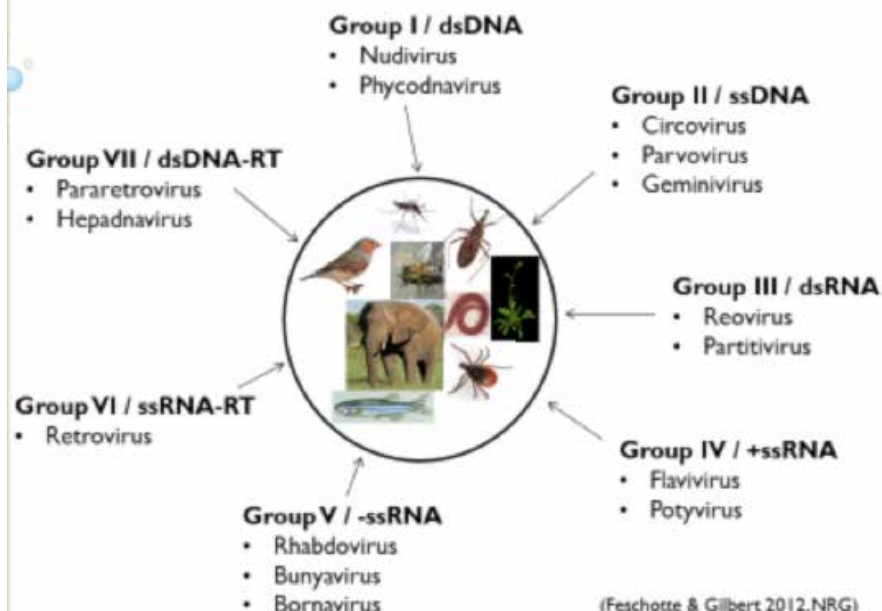
Le transfert horizontal de génome viral, parfois appelé événement d'endogénéisation virale, se répète de manière récurrente au cours de l'évolution des vertébrés depuis 500 millions d'années. Environ 8 % du génome humain dérive de ces multiples événements d'endogénéisation.

Les rétrovirus étaient les seuls types de virus endogènes connus jusqu'à une dizaine d'années. Les progrès phénoménaux réalisés en génomique ont permis de séquencer un grand nombre de génomes complets d'espèces eucaryotes et notamment animales, ainsi qu'un grand nombre de génomes viraux. Leur comparaison a permis de découvrir de nouveaux types de virus endogènes.

Tous les grands types de virus ont été sujets à endogénéisation à un moment ou l'autre de l'évolution des eucaryotes : qu'ils soient à ADN, à ARN, à simple ou double brin, qu'ils se répliquent dans le noyau ou dans le cytoplasme des cellules de leurs hôtes.

Ils ont été retrouvés intégrés dans le génome d'un ou plusieurs de leurs hôtes eucaryotes et même d'animaux.

Tous les types de virus peuvent être sujets à endogénéisation



Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux

Ces nouveaux types de virus endogènes présentent un grand intérêt. Ils ont permis de découvrir de nombreux aspects de la biologie des virus et des interactions entre hôtes et virus.

Je vais illustrer ce point par quelques-uns des résultats de notre laboratoire.

Tout d'abord, comment rechercher les virus endogènes intégrés dans le génome d'une espèce hôte ?

Pour cela, on établit préalablement la liste des génomes viraux séquencés, obtenus à partir de banques de données publiques. Il y en a environ 5 000 disponibles.

Nous nous sommes focalisés sur les génomes endogènes non rétroviraux qui ont été comparés aux génomes d'animaux grâce à divers algorithmes bio-informatiques.

Puis, nous nous sommes intéressés aux serpents par opportunisme. Une collègue a réalisé le séquençage du génome d'une espèce de crotale à l'université de Portland aux États-Unis et nous a donné un grand nombre d'échantillons de tissus nous permettant de vérifier les résultats obtenus par bio-informatique.

Pour la majorité des reptiles, nous ne savions quasiment rien de la flore virale qui infecte ou qui a infecté par le passé les serpents.

Nous avons montré que le génome de *Crotalus mitchellii* possédait 9 fragments de virus endogènes appartenant à 3 grandes familles de virus :

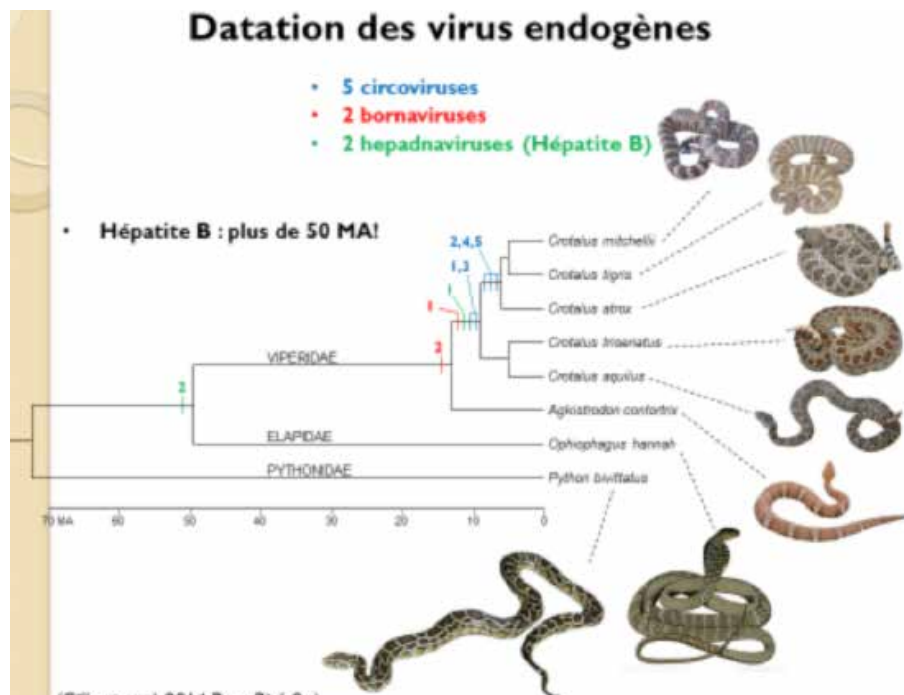
- Deux fragments d'*Hepadnaviridae*, virus à ADN partiellement double brin et circulaire, la famille du virus de l'hépatite B que l'on trouve chez l'homme, mais également chez plusieurs espèces d'oiseaux ;
- Deux fragments de *Bornaviridae*, virus à ARN présents chez les chevaux et les moutons provoquant des troubles neurologiques ;
- Cinq fragments de *Circoviridae*, virus à ADN simple brin, responsable de plusieurs maladies chez le chien et le porc.

Le premier intérêt de l'étude de ces transferts, est de nous permettre de mieux caractériser les familles d'hôtes et les flores virales qui ont infecté, dans le passé, une espèce donnée.

Ensuite, ces virus endogènes peuvent être considérés comme des fossiles génomiques apportant des informations sur l'évolution des familles de virus actuels. Jusqu'à récemment, on avait très peu d'informations sur cette évolution.

On peut ainsi dater, par plusieurs techniques, les événements d'endogénéisation qui se sont produits dans le génome de leurs hôtes. Une de ces techniques repose sur le principe selon lequel, lorsqu'on trouve un fragment de virus endogène exactement au même endroit dans le génome de deux espèces, sur un locus orthologue, ce virus aura été intégré dans l'ancêtre de ces 2 espèces. Si les temps de divergence entre les deux espèces sont connus, on peut attribuer un âge absolu à cet événement d'endogénéisation. Par la suite, il peut nous aider à déterminer l'origine, l'âge d'une famille de virus actuels.

Grâce à cette approche, nous avons pu



montrer que la grande majorité des virus endogènes trouvés chez ces espèces de serpents étaient issus d'événements d'endogénéisation récents sur l'échelle géologique, autour d'une dizaine de millions d'années. Par exemple, les fragments 1 et 3 de circovirus endogènes ont été trouvés au même locus génomique chez toutes les espèces du genre *Crotalus*. Nous avons pu conclure que ces fragments avaient été endogénéisés dans l'ancêtre du genre *Crotalus* il y a un peu moins de 10 millions d'années.

Un des deux fragments d'hepadnavirus endogène trouvé chez *Crotalus mitchellii* était également présent au même locus génomique chez toutes les espèces de Viperidae mais également chez une espèce d'*Elapidae* le cobra royal ; tout en étant absent dans le génome du python réticulé. Cela signifie que son intégration a eu lieu dans le génome d'un clade c'est-à-dire un ancêtre commun qui rassemble les Viperidae et les *Elapidae*. Celui-ci a été daté de manière fiable à au moins 50 millions d'années.

La famille d'*Hepadnaviridae*, contenant le virus de l'hépatite B que l'on retrouve chez l'homme et les oiseaux a donc plus de 50

millions d'années alors qu'on pensait que les *Hepadnaviridae* avaient moins de 300 000 ans !

Précédemment, les virus de l'hépatite B qui circulent aujourd'hui chez l'homme avaient été datés à moins de 6 000 ans, sur la base d'études qui comparent les séquences trouvées dans les populations humaines. Moins de 6 000 ans avaient été également proposés pour les hépatites B aviaires. Pour la famille globale des *Hepadnaviridae*, l'origine probable avait été extrapolée aux alentours de 300 000 ans.

Nous avons ici une preuve directe que cette origine est beaucoup plus ancienne et date en fait de plus de 50 millions d'années.

Quelles sont nos connaissances sur les virus endogènes présents dans le génome de l'homme ?

En grande majorité ce sont des rétrovirus. Ils sont d'une très grande diversité. Ils se répartissent en 31 familles différentes, en nombre de copies très important. Il y a 440 millions de fragments de virus endogènes dans notre génome ; cela représente plus de 8 %. C'est considérable, cinq fois la proportion des exons, la partie codante des

Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux

gènes.

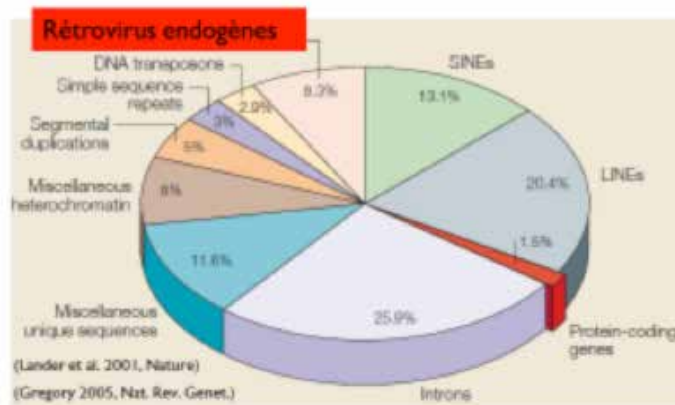
La plupart de ces rétrovirus endogènes humains sont issus d'événements d'endogénéisation qui se sont produits il y

a très longtemps au cours de l'évolution des vertébrés et des mammifères. La plupart d'entre eux sont inactifs, dégradés et n'ont pas de fonction connue.

Cependant, il y a quelques exceptions.

Virus endogènes chez l'homme

Retroviridae: 31 familles – 440 M de fragments – 240 Mb – >8% du génome



- Inactifs – dégradés – pas de fonction connue

C'est le cas du rétrovirus HML2, le plus récent présent dans le génome humain. Certaines copies sont polymorphes dans les populations humaines. Elles sont présentes chez des individus et pas chez d'autres. Une étude récente a montré que ces copies pouvaient générer la formation de particules virales potentiellement infectieuses au cours du développement normal de l'embryon.

Des particules virales issues de ces rétrovirus endogènes peuvent aussi être générées dans certains stress cellulaires liés à d'autres maladies infectieuses.

Par ailleurs, certaines copies de ces rétrovirus endogènes ont servi à créer de la nouveauté génétique.

C'est le cas de séquences non codantes qui font partie du réseau de régulation des gènes de plusieurs voies de signalisation qui interviennent dans l'immunité.

Mais c'est aussi le cas de séquences de régions codantes. Nous avons par exemple dans notre génome deux gènes, les syncytines, dérivés de copies de rétrovirus endogènes

qui ont été intégrées, l'une il y a 40 millions d'années et l'autre 25 millions d'années. Ces deux syncytines dérivent de fragments qui encodent normalement l'enveloppe du virus. Elles sont impliquées dans la formation du placenta et du syncytiotrophoblaste qui assure les échanges entre la mère et le fœtus.

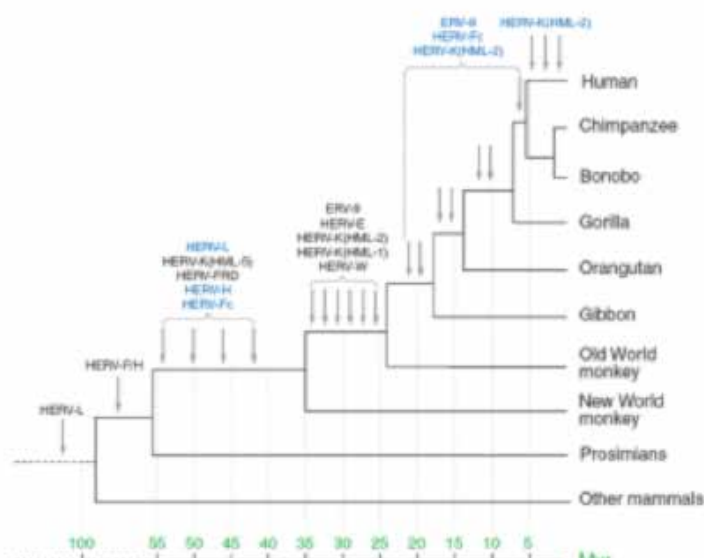
Outre des rétrovirus, il y a aussi quatre fragments de bornavirus, résultant d'endogénéisations datées à 40 millions d'années. On ne connaît pas leur fonction, mais certains d'entre eux sont transcrits et potentiellement capables de générer des protéines fonctionnelles.

Les virus d'herpès peuvent s'intégrer dans les



Virus endogènes chez l'homme

Retroviridae: 31 familles – 440 M de fragments – 240 Mb – >8% du génome



télomères de certains de nos chromosomes. Si cela se produit dans la lignée germinale ils sont transmis aux descendants. Ainsi 0,5 % de la population humaine serait porteuse de ces intégrations. Une étude a montré que lorsqu'on en est porteur, on aurait plus de chances de développer des maladies de type angine de poitrine.

En résumé, ces échanges de gènes dans le sens virus à hôte touchent une grande diversité de virus. Tous les types de virus que nous connaissons peuvent s'intégrer dans le génome de leurs hôtes. Ces intégrations sont pour la plupart accidentelles et probablement catalysées par les mécanismes de réplication d'ADN encodés dans tous les génomes eucaryotes.

L'étude de ces transferts horizontaux a permis de faire la lumière sur divers aspects de la biologie des virus tels que leur spectre d'hôtes, de mieux caractériser les communautés virales infectant les organismes ; elle nous renseigne sur l'histoire évolutive des familles virales actuelles.

Les transferts horizontaux dans le sens d'hôtes à virus se sont également produits de manière récurrente au cours de l'évolution.

Le génome de certains virus possède de nombreux gènes qui ont une origine cellulaire, provenant de taxons bactériens ou d'eucaryotes. C'est le cas par exemple du génome de certains virus d'herpès. Plus de 13 % des gènes de l'herpès proviennent de transferts horizontaux d'organismes eucaryotes vers le génome de l'herpès virus. Ces gènes ont été gardés par les virus probablement parce qu'ils ont dû leur apporter un bénéfice. Un grand nombre de ces gènes semblent être impliqués dans l'inhibition des défenses antivirales mises en place par les hôtes ; ils aideraient donc le virus à mieux se répliquer.

En revanche, on ne connaît pas comment ces gènes peuvent sauter du génome de l'hôte vers celui du virus ; quels sont les mécanismes et la fréquence des transferts de gènes hôtes vers les génomes viraux.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons analysé les données de séquençage à très haut débit de population de génomes viraux.

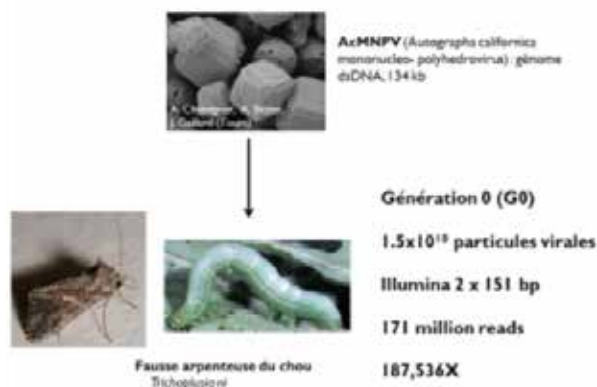
Des données ont été produites par nos collègues de l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte à l'université de Tours, en infectant des chenilles de la fausse arpeuteuse du chou par une population de

Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux

baculovirus AcMNPV.

Les baculovirus sont des virus à grand génome ADN double brin connus pour infecter une large diversité d'insectes, principalement des lépidoptères.

Séquençage de populations de génomes viraux (IRBI – Tours)



Après la mort des chenilles infectées par ces virus, nos collègues ont réussi à purifier un grand nombre de particules de baculovirus dont ils ont extrait l'ADN pour le séquencer finement.

En complément, avec un autre lot de particules virales ont été générés 10 cycles d'infections successifs sur 10 lignées différentes de la fausse arpeuteuse du chou et 10 autres sur 10 lignées d'une autre espèce de papillon, le légionnaire de la betterave.

Pour ces 20 lignées différentes, le dernier échantillon de virus qui était extrait des derniers cycles d'infections a été récolté, purifié et aussi séquencé très finement.

Grâce à ce séquençage très précis, nous avons pu examiner si certains gènes de papillon se retrouvaient dans le génome des virus après cette série d'infections expérimentales.

Pour cela nous avons rassemblé toutes les séquences virales produites (l'équivalent de 400 000 génomes viraux) et nous avons comparé ces séquences à celles des deux espèces de papillons et au génome du baculovirus AcMNPV grâce à des algorithmes bioinformatiques. Nous avons également vérifié nos résultats grâce à des méthodes plus traditionnelles de type PCR.

Il a été mis en évidence un très grand nombre de séquences chimériques qui contiennent une jonction entre une partie 100 % identique au niveau nucléotidique au génome du virus et une autre partie qui correspond à 100 % d'identité nucléotidique à une séquence de papillon.

Un très grand nombre d'événements de recombinaisons se sont donc produits au cours de ces infections expérimentales entre le génome du virus et celui du papillon que ce soit dans le premier jeu de données de la génération zéro, mais également dans tous les autres 20 jeux de données générés à la suite.

Ainsi, chaque fois que le virus infecte des chenilles, des fragments de génome du papillon sont capables de sauter dans le génome du baculovirus.

Nous avons identifié 106 séquences différentes, responsables de plus de 13 000 intégrations. Certaines séquences se sont intégrées de nombreuses fois à différents endroits du génome ; 79 sont des éléments transposables répartis en 13 familles.

Les éléments transposables sont des séquences d'ADN présentes dans le génome de tous les êtres vivants, capables de sauter d'un locus à l'autre dans les génomes, soit entre deux chromosomes ou au sein d'un même chromosome.

Nous avons également trouvé 27 autres séquences dont la nature est indéterminée puisqu'elles ne ressemblent à aucune protéine annotée dont la fonction soit connue actuellement. Nous suspectons qu'elles proviennent du génome du papillon puisqu'elles ressemblent à des séquences de génomes de papillons disponibles dans les banques de données.

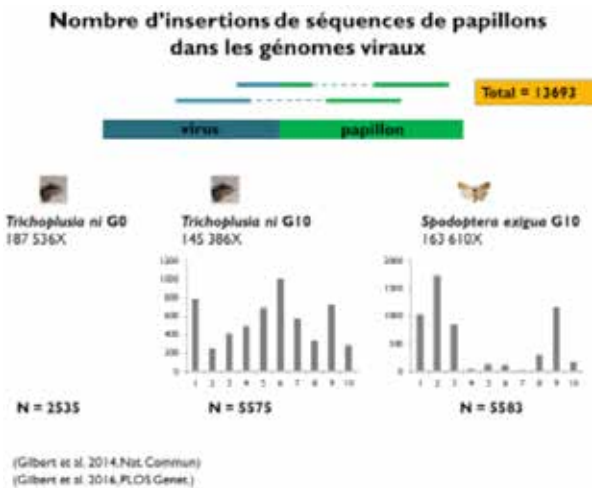
Ce sont d'autres types de réactions de recombinaisons qui sont à l'œuvre pour expliquer leur intégration.

Ces gènes provenant d'un hôte, après avoir été incorporés par le virus, peuvent-ils



être transmis ensuite par le virus à d'autres hôtes ?

Autrement dit, les virus peuvent-ils être des vecteurs de transferts horizontaux de gènes entre animaux ?



Aujourd'hui, plus de 300 cas de transferts horizontaux ont été décrits qui impliquent des espèces animales. Il y en certainement beaucoup d'autres à découvrir.

Nous avons par exemple, montré, il y a quelques années, que 4 familles d'éléments transposables avaient été transférées horizontalement entre une espèce de punaise et plusieurs espèces de mammifères et d'autre vertébrés tétrapodes.

Une hypothèse régulièrement mise en avant dans la littérature est que les virus pourraient faciliter ces transferts.

Aujourd'hui, il n'existe pas de démonstration formelle que cela soit possible chez les animaux.

Nous avons conduit plusieurs analyses pour étayer cette hypothèse. Nous avons, entre autres, calculé la fréquence de séquences de papillon que l'on peut espérer trouver dans les populations virales naturelles sur la base de nos résultats.

Après calculs, nous avons estimé qu'en moyenne, dans les populations de baculovirus, 5 sur 100 sont porteurs d'au moins une intégration d'éléments

transposables ou de séquences d'une autre nature provenant du papillon.

Les baculovirus sont des gros virus présents dans la nature sous forme de corps d'occlusion. C'est une matrice protéique constituée d'une protéine appelée polyhédrine, qui permet au baculovirus de rester infectieux dans l'environnement, en dehors du corps de son hôte, pendant plusieurs années.

Chaque corps d'occlusion est constitué de 50 à 100 virions. Chaque virion contient entre 5 et 10 génomes. Lorsqu'une chenille s'infecte en ingérant des plantes contaminées, elle ingère des dizaines de milliers de corps d'occlusion, donc des milliers de transposons de papillons qui proviennent de la chenille précédemment infectée par ces virus.

Implications – biologie du baculovirus

5 séquences de papillons dans 100 génomes viraux



Si nous couplons cette observation avec le fait que ces virus sont connus pour avoir un tropisme cellulaire assez large, cela suggère que chaque infection qui n'aboutirait pas à la mort d'une chenille représenterait une opportunité de transfert horizontal assez importante.

Ceci peut avoir des implications en termes de recherche plus appliquée.

En effet les baculovirus sont utilisés aujourd'hui comme biopesticides. Ils présenteraient plusieurs avantages sur certains pesticides chimiques. Ils sont réputés sans danger pour l'homme et l'environnement. Ils seraient moins chers à produire que certains

Transfert horizontal de gènes entre virus et animaux

pesticides chimiques. Plusieurs formulations ont été mises au point et sont disponibles dans le commerce.

Implications ? Baculovirus = Biopesticides

- Sans danger pour l'homme et l'environnement
- Moins chers que les pesticides chimiques
- Produits *in vivo* (en chenilles)



1 milliard de virus/m²
(plusieurs millions d'hectares traités)

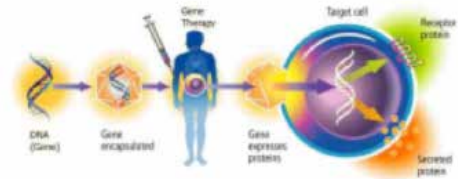
(Hesse et al. 2015, Virus)

Carpovirusine®
SPOD-X®
Spodopterin®
Granupon®
Gemstar®



Implications ? Baculovirus = Vecteurs de gènes

- Faciles à manipuler et à produire en grande quantités
- Forte capacité cargo (38 kpb)
- Pénètrent et s'expriment dans les cellules humaines
- Ne se répliquent pas – peu cytotoxiques



- Produits en masse *in vivo* (en chenilles) ou en cellules d'insectes

(Airene et al. 2013, Mol. Ther.)

En conclusion, les transferts horizontaux, les échanges de gènes entre virus et hôtes ne sont pas restreints au monde bactérien ; ils sont plus fréquents que ce que nous pouvions penser auparavant, chez les eucaryotes et notamment chez les animaux.

En termes de perspectives de recherche, concernant les transferts de virus vers leurs hôtes, il serait très intéressant d'étudier de manière systématique le rôle de ces virus intégrés dans le génome de leurs hôtes.

Pourraient-ils être utilisés par l'hôte comme moyen de lutter contre les virus exogènes ? Cela a déjà été montré dans certains exemples de rétrovirus endogènes. Est-ce le cas pour les autres types ?

Les virus endogènes ne pourraient-ils pas être une source nouvelle de diversité génétique bénéfique aux virus exogènes ? Pourrait-il y avoir des échanges via des éléments de recombinaison entre ces deux types de virus qui pourraient éventuellement être bénéfiques aux virus exogènes ?

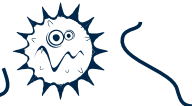
Concernant les transferts de l'hôte vers le virus, il serait intéressant de savoir si la fréquence de transfert détectée entre les papillons et les baculovirus est aussi importante dans d'autres systèmes.

De plus, cette fréquence étant mesurable, quel peut être l'impact de ces transferts sur la réplication virale au sein d'un hôte donné.

Ces baculovirus sont produits *in vivo* dans des chenilles. Nous pouvons suspecter, étant donné nos résultats, qu'ils contiennent des transposons de chenilles. Pulvérisées sur des milliers d'hectares, ces pratiques agricoles pourraient avoir un impact sur la biologie des insectes dans la nature. Cela ne pourrait-il tout simplement pas augmenter les taux de transfert horizontal dans certaines régions du monde ?

Par ailleurs les baculovirus pourraient être aussi de bons vecteurs de gènes en thérapie génique, car ils présentent un certain nombre d'avantages : faciles à manipuler, à produire en grande quantité. Il est possible d'intégrer une grande portion d'ADN étranger dans leur génome. Ils sont connus pour pénétrer et pouvoir s'exprimer de manière importante dans les cellules humaines. Malgré cela, ils sont incapables de se répliquer dans ces cellules, donc ils sont peu cytotoxiques.

Ces baculovirus utilisés pour développer d'éventuels vecteurs de gènes sont également produits dans des chenilles ou des cellules d'insectes. Nous pouvons penser qu'ils pourraient être porteurs de plusieurs copies de transposons de papillons. Cela peut-il poser un problème dans leur application potentielle en thérapie génique ?



Il serait intéressant de démontrer formellement que les virus peuvent servir de vecteurs de transferts horizontaux. Nous prévoyons de le faire dans un futur proche au laboratoire.



Je voudrais remercier mes collègues poitevins et tourangeaux impliqués dans ces travaux, ainsi que les diverses sources de financement.

(Applaudissements)

Jean-Pierre DECOR.- Merci Clément Gilbert pour toutes ces informations concernant les transferts de gènes. Nous avons appris que nous sommes une chimère d'un virus et d'un animal qui n'est pas connu.

Clément GILBERT.- Certains disent que nous serions apparentés aux virus.

Jean-Pierre DECOR.- Le HIV n'induit-il pas l'expression des virus endogènes ?

Clément GILBERT.- Effectivement, c'est une des pathologies connues pour induire l'expression de certaines copies, notamment de HML2 dont j'ai parlé.

Gérard ORTH.- Les transferts horizontaux de gènes entre cellules eucaryotes sont passionnants. Quelles sont les conséquences pour l'hôte de ces séquences virales ?

Thierry HEIDMANN, il y a quelques années, nous avait clairement convaincu que l'endogénéisation des rétrovirus avait joué un rôle majeur dans la placentation par l'intégration de gènes des protéines virales (gènes fusogènes), à l'origine des syncytiotrophoblastes que vous avez évoqués. C'est bénéfique et nous sommes

redevables à l'endogénéisation des rétrovirus de la manière dont nous sommes conçus.

Une deuxième question concerne le rôle que pourrait jouer l'expression de rétrovirus dans des cellules tumorales, dans la pathogénèse de ces tumeurs, comme le mélanome : les glycoprotéines d'enveloppe non seulement sont fusogènes, mais comprennent des segments immunodépressifs. Autrement dit, des tumeurs qui exprimeraient des rétrovirus endogènes annihileraient en partie les réponses immunitaires de l'hôte.

C'est un exemple, mais il y en a d'autres, notamment pour les maladies neuropsychiatriques. Au-delà de l'histoire, la paléo-virologie, le développement humain, des mammifères ou des insectes, cela pose des problèmes concrets qui nécessiteraient quelques éclaircissements.

Clément GILBERT.- Ce que vous avez évoqué n'est pas la seule manière dont les virus endogènes peuvent avoir un impact négatif sur leurs hôtes. Ces copies de rétrovirus endogènes peuvent générer de nombreux réarrangements génomiques, qui seraient la source de délétions majeures de régions génomiques. Certaines de ces délétions sont responsables de types d'infertilité qui touchent l'homme. Il y a en effet différentes manières dont les rétrovirus endogènes peuvent nous impacter négativement.

Gérard ORTH.- Avec des conséquences fâcheuses.

Clément GILBERT.- Certainement.





**Pr Philippe MOULLIER,
MD, PhD**

*INSERM/CHU Nantes
AFM-Téléthon*

Dr Jean-Pierre DECOR.- Après la phagothérapie présentée ce matin, nous allons découvrir d'autres thérapies possibles par l'utilisation des virus. Philippe MOULLIER est le grand spécialiste de ces questions.

Depuis 1995, il est directeur de l'unité INSERM thérapie génique des maladies neuromusculaires et de la rétine à Nantes.

Médecin néphrologue de formation, il est un des pionniers de la thérapie génique.

Il est également professeur associé du département de génétique moléculaire et microbiologie de l'université de Floride.

Expert dans plusieurs organismes (EMA, l'Afssaps) et membre du programme de thérapie génique de la NHLBI (American National Heart, Lung and Blood Institute), Philippe MOULLIER a été directeur scientifique du Généthon de 2009 à 2011.

Son unité INSERM est une composante d'Atlantic Gene Therapies, groupement de laboratoire nantais mettant au point des stratégies de thérapie génique appliquées à des maladies génétiques.

Il a par ailleurs assuré la codirection scientifique de l'ouvrage « La génétique, science humaine » paru en 2004.

Pr Philippe MOULLIER.- Avant de commencer, je tiens à vous remercier, ainsi que les Fondations, pour cette invitation.

En effet, suite à la lecture d'un article, cela fait presque 30 ans que je m'intéresse à la thérapie génique. Transférer un gène à des patients possédant une mauvaise copie avait une certaine logique et je trouvais cela intéressant. Ce serait une forme nouvelle de médicament.

À cette époque, c'était simplement une idée. En France, nous avons une particularité : le Téléthon ; sans lui, je ne pourrais pas financer mon laboratoire. En effet, depuis 20 ans il assure 30% de mon budget.

Si la France est parmi les trois pays leaders pour la thérapie génique, c'est en partie grâce au téléthon.

Il y a aussi une aide considérable de l'État sous différentes formes, des ministères concernés, y compris le ministère de l'Industrie. Les collectivités territoriales, en particulier les Pays de la Loire sont extrêmement dynamiques dans la recherche médicale.

Le secteur privé intervient également, en plus des aides de l'État

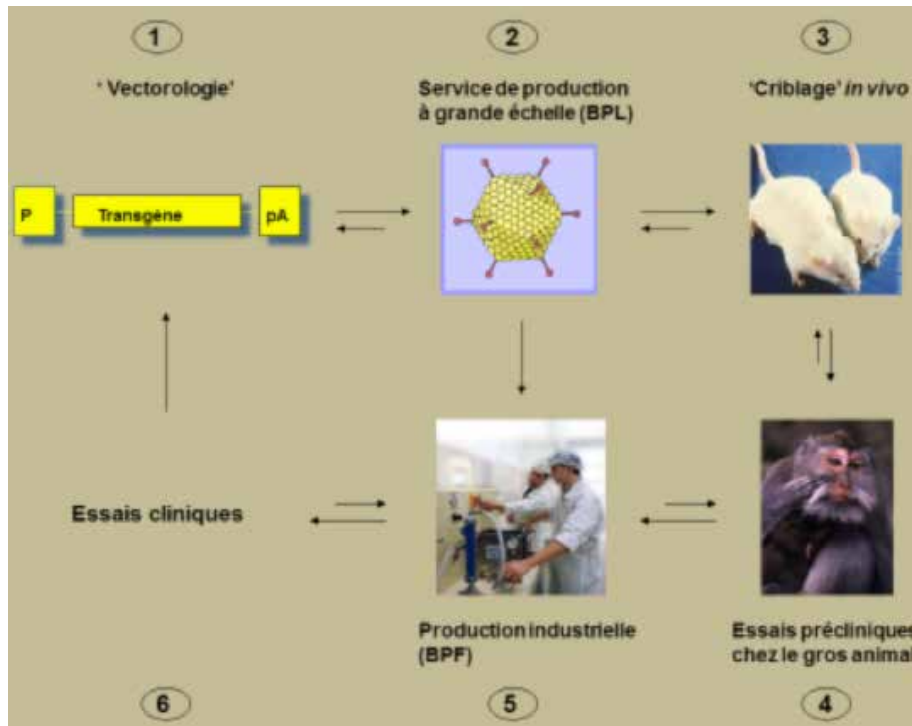
Lorsque notre communauté a commencé à travailler sur ces nouveaux concepts, c'était vraiment de la recherche fondamentale. A l'institut Pasteur dans les années 1988/1989, nous étions un petit groupe de cinq personnes en France à faire de la thérapie génique et à y croire.

Nous n'étions absolument pas capables de transférer le moindre gène dans un organisme quel qu'il soit. Lorsque nous avons réussi à en faire un dans une cellule in vitro ; ce fut un événement.

Aujourd'hui, je vais vous montrer à quel point nous avons pu avancer.

Cela est le résultat d'un groupe permanent, à Nantes, composé d'une centaine d'individus de formations diverses : pharmaciens, vétérinaires, scientifiques, personnes spécialisées dans le réglementaire, managers, qui depuis 20 ans accumulent de l'expertise.

La dernière génération de médicaments dérivés des virus



C'est aussi le résultat d'un réseau composé du Généthon à Évry, l'institut de myologie à la Pitié Salpêtrière, en France et d'équipes aux États-Unis.

Des étapes extraordinaires ont été franchies. La première consiste à définir le médicament : **le gène qui doit être transporté** avec, en amont, le bon promoteur et en aval le signal de polyadénylation.

S'il est possible d'introduire cet ensemble chez un patient hémophile avec le transgène qui code pour le facteur IX, le facteur VIII ou d'autres facteurs de l'hémophilie, en théorie, la maladie génétique est traitée pour toujours. C'était mon raisonnement, il y a 30 ans, en me disant que c'était de la bonne médecine. L'alternative : apporter un facteur de l'hémophilie tous les jours ou une fois par semaine par injection n'est pas un traitement définitif.

Une fois ce transgène défini, la deuxième étape est comment l'administrer: En effet si un gène est injecté seul dans un individu ou une souris, il n'arrivera jamais à sa cible. Les mécanismes de défense font que ce gène, sous la forme molécule d'ADN, va

être dégradé immédiatement par toutes les protéines présentes dans le sérum ou dans les tissus interstitiels. Il n'aura aucune chance d'arriver à la cible.

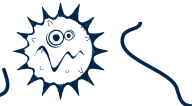
Il faut trouver un moyen de transporter cette molécule d'ADN sans l'altérer. **Le meilleur moyen trouvé jusqu'à présent ont été les virus.** Nous pouvons prendre comme vecteur un virus présent dans la nature, un adénovirus, dans lequel nous insérerons le gène à exprimer chez les patients.

Après l'avoir fabriqué il faudra le tester chez des animaux créés à dessin pour représenter la maladie génétique à guérir. Aujourd'hui, grâce au génie génétique, il est possible de générer toutes sortes de maladies parfois très complexes chez l'animal en particulier les souris ou les rats.

Parfois, la nature nous a donné spontanément des animaux de grande taille qui ont cette maladie. En effet des mammifères peuvent souffrir des mêmes maladies génétiques que les humains.

Ensuite il faut transposer ce que nous aurons observé chez les rongeurs aux mammifères quand les modèles existent.

En l'absence de ces modèles, avec la preuve



de concept chez les rongeurs, nous allons directement dans des unités particulières, les salles blanches, souvent d'établissements pharmaceutiques, produire les médicaments. Puis ils seront injectés, dans des phases I/II, à des patients.

Au départ, nous redoutions d'avoir des phases I/II de thérapie génique pas très efficaces avec de nombreux aller-retour entre recherche et ces phases.

Ce n'a pas été le cas. Non seulement mon groupe, mais bien d'autres dans le monde, sont déjà sur des phases III. Un premier médicament de thérapie génique a même été mis sur le marché. Cela va beaucoup plus vite que je ne l'avais anticipé.

Cependant, j'avais bien noté dans Nature Reviews en 2008 une phrase de Jonathan KIMMELMAN qui m'avait frappé :

« *Gene transfer has often been characterized as permanently 5 years away from clinical application* »,

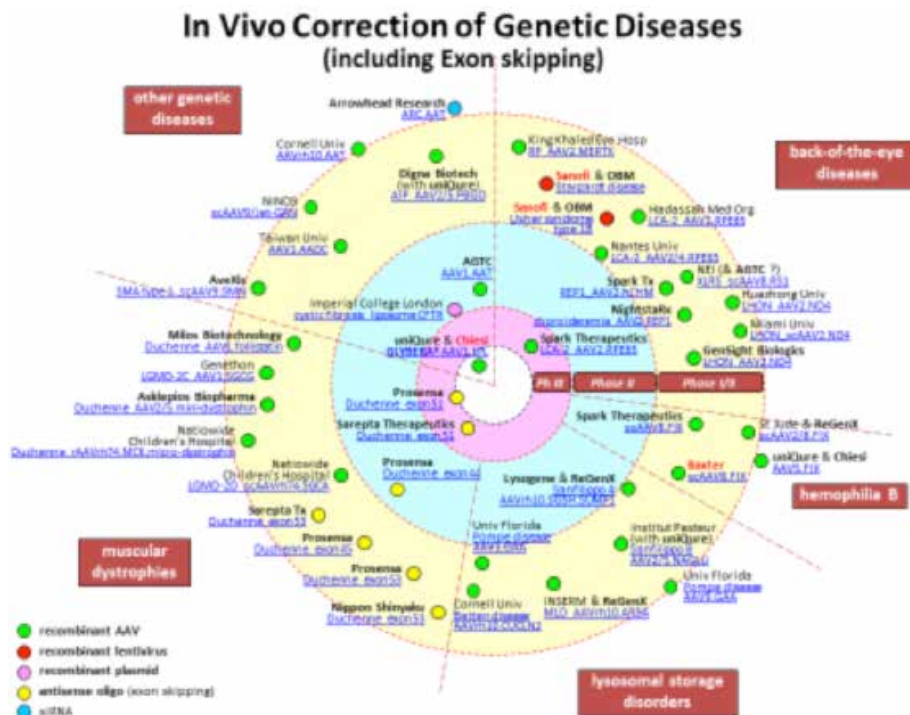
C'était cynique mais malheureusement

exact. Très longtemps, les personnes qui travaillaient sur la thérapie génique étaient persuadées de l'imminence du succès. Combien de fois il nous a été dit : la thérapie génique va traiter tout ce que nous voulons, y compris la stupidité chez l'homme ! Tout était matière à faire de la thérapie génique.

En fait, nous avons beaucoup peiné pour trouver ce qu'il fallait faire pour que cela fonctionne. Pendant des années, je commençais toujours mes conférences en montrant cette phrase pour nous permettre de rester humble. Un concept simple est souvent compliqué à mettre en œuvre chez l'homme.

Cependant, je vais bientôt pouvoir enlever cette citation et ne plus la présenter excepté pour rappeler l'histoire.

Sur le tableau suivant, vous avez une image qui donne une réelle idée de l'activité. Au centre, se situe la mise sur le marché du médicament. En périphérie, ce sont les démarrages des phases I/II dans différentes indications :



La dernière génération de médicaments dérivés des virus

- ✗ En bas à gauche, la dystrophie : la myopathie de Duchenne et d'autres dystrophies musculaires.
- ✗ En bas à droite, les maladies de surcharge lysosomale.
- ✗ À droite, c'est l'hémophilie B.
- ✗ En haut à droite, les maladies génétiques qui touchent la rétine.
- ✗ En haut à gauche, ce sont toutes les autres maladies génétiques.

Chaque point est une société de biotechnologie qui s'est créée dans les trois dernières années.

Faire un médicament de thérapie génique à partir d'un virus nécessite plusieurs étapes.

Il faut d'abord enlever le maximum des gènes du virus pour le désarmer. Il n'est pas possible d'enlever la totalité. En effet, dès qu'un virus n'a plus son matériel génétique à l'intérieur, il devient très fragile à manipuler. L'espace vide sert à insérer le gène d'intérêt que nous voulons véhiculer et faire exprimer chez le patient.

Plus on enlève du génome du virus de départ, plus cela laissera de la place et plus le virus sera sûr. Vu de l'extérieur, c'est un virus normal. Seulement, dans la cellule, au lieu d'injecter son génome qui le rend dangereux, il va injecter le génome recombinant, véhiculant la « cassette d'expression » pour traiter cette maladie génétique.

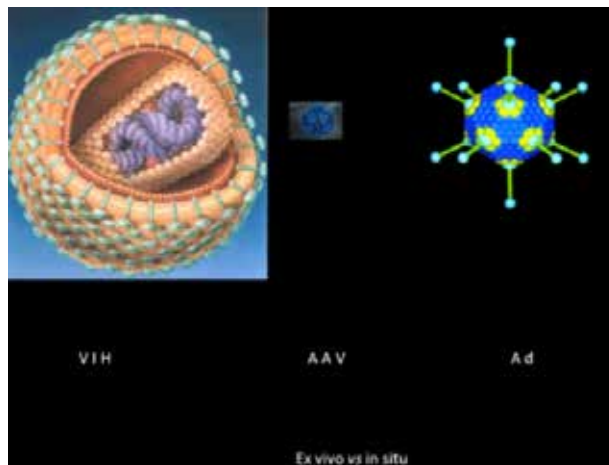
Il s'agit, en premier lieu, de maladies monogéniques, à savoir un gène, un médicament.

Selon la nature du virus utilisé au départ, cette information génétique peut s'intégrer (c'est le cas des rétrovirus ou des virus tels que le VIH) ou non.

Il existe trois sortes de virus possibles.

Après avoir pas mal travaillé pour choisir le meilleur vecteur par indication, trois virus principaux représentent 90 % des essais

cliniques dans le monde, quelle que soit la phase de développement du médicament.



Sur le schéma, ils sont présentés selon leur taille : le VIH fait 150 nanomètres de diamètre, l'adénovirus, à droite, en fait 80/90, c'est un virus non enveloppé, qui a plusieurs particularités. Au milieu, l'AAV (adeno associated virus) est un parvovirus dépendant. Il ne peut pas pousser tout seul, il lui faut des fonctions auxiliaires. L'AAV fait à peu près 25 nanomètres.

Du point de vue du médicament, la taille du virus a des conséquences en termes de pharmacocinétique, de pharmacodynamique et de stabilité.

L'adénovirus est essentiellement utilisé pour des applications anti cancer. On obtient des résultats très intéressants dans les cancers tête et cou. En véhiculant des gènes suicides toxiques, les adénovirus vont interférer avec la multiplication cellulaire.

Le virus du VIH est utilisé depuis maintenant presque 10 ans avec plusieurs succès thérapeutiques.

L'AAV est le vecteur développé à Nantes depuis de nombreuses années.

Examinons d'abord les développements avec comme vecteurs des Rétrovirus et le VIH

Avec le **rétrovirus**, dérivé de Moloney (rétrovirus murin), c'est en 2002 qu'il a été montré qu'il était possible de traiter une maladie génétique monogénique, chez un



chien.

Les chiens peuvent être atteints d'une maladie de surcharge lysosomale, un déficit en un bêta-glucosidase. Une colonie exprime spontanément cette maladie. Elle affecte l'ensemble de l'organisme et le cerveau. Ayant reçu par voie intraveineuse un rétrovirus qui véhicule le gène manquant, ces chiens n'ont pas présenté les grosses difficultés articulaires qui ont affecté les témoins non traités.

Ce résultat a créé un véritable coup de tonnerre. Après presque 20 ans d'investigation, nous avons ainsi la preuve que, si nous étions capables de véhiculer un gène et de le transférer là où il doit être, les résultats pouvaient être spectaculaires. Ces chiens ont été euthanasiés il y a très peu de temps en raison de leur âge, ils avaient gardé à peu près le même phénotype.

C'est la même année que le groupe de Marina CAVAZZA-CALVO et d'Alain FISCHER à Necker a commencé de traiter, avec ce même type de vecteur rétroviral de souris, des enfants-bulles pour un déficit immunitaire conjugué T et B par une mutation sur la chaîne gamma de différents récepteurs d'interleukine.

Vous avez tous entendu parler de l'effet secondaire majeur observé chez ces enfants lié à une intégration spécifique de ces virus. Les rétrovirus dérivés de la souris ont la particularité de s'intégrer essentiellement à l'origine des gènes là où la machinerie qui les exprime est en route.

Ils ont démontré que cet effet secondaire était lié à une activation d'un oncogène consécutive à l'insertion du gène médical.

Très vite, nous nous sommes rendu compte qu'utiliser des **vecteurs dérivés du VIH** ne créait pas ce type de problème. Ainsi, le groupe de Patrick AUBOURG et de Nathalie CARTIER, à Paris (Saint-Vincent-de-Paul), en 2009, a utilisé ces virus dérivés du VIH dans l'adrénoleucodystrophie, maladie du peroxysoxe, liée à un transporteur membranaire. C'est une maladie

démyélinisante. Très rapidement les enfants ont une atteinte neurologique majeure avec une morbidité très élevée et meurent avant l'adolescence.

Nathalie CARTIER et Patrick AUBOURG ont traité ces enfants avec ce vecteur. Des cellules souches de la moelle de ces enfants sont prélevées et in vitro, le vecteur VIH avec le gène médical leur est additionné. Ces cellules sont réinjectées quelques jours après. Les effets thérapeutiques étaient très nets, l'IRM a permis de conclure à l'efficacité du traitement sur ces enfants.

Plus récemment, en 2013, une équipe italienne, comparable à celle du Généthon, a montré qu'il était possible de traiter d'autres pathologies avec le vecteur VIH. Ce sont des enfants atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich, qui associe une thrombopénie, un déficit immunitaire et des atteintes cutanées majeures. En transférant le gène de la protéine WAS dans des cellules souches hématopoïétiques à l'aide du vecteur VIH et en réimplantant ces cellules chez les patients, ils avaient une normalisation du phénotype avec un comptage des plaquettes correct et le système immunitaire rétabli. C'est un nouveau très beau succès thérapeutique lié à l'utilisation du VIH comme recombinant.

Encore plus récemment, cette année, vous avez sans doute entendu parler du traitement de certaines leucémies réfractaires ou de lymphomes B en utilisant le récepteur CAR. Il s'agit d'introduire dans certaines cellules T du malade, avec un vecteur VIH, un récepteur qui va s'exprimer à la surface de ces cellules. Elles vont être capables de reconnaître l'antigène tumoral et ainsi entraîner une destruction de la tumeur. Des résultats spectaculaires ont ainsi été obtenus chez certains enfants atteints de ces leucémies.

Après le vecteur VIH, je vais vous parler du vecteur AAV que nous affectionnons à Nantes.

N'étant pas entouré de membrane, cela en fait un virus extrêmement solide. Il est possible de le conserver lyophilisé. C'est

La dernière génération de médicaments dérivés des virus

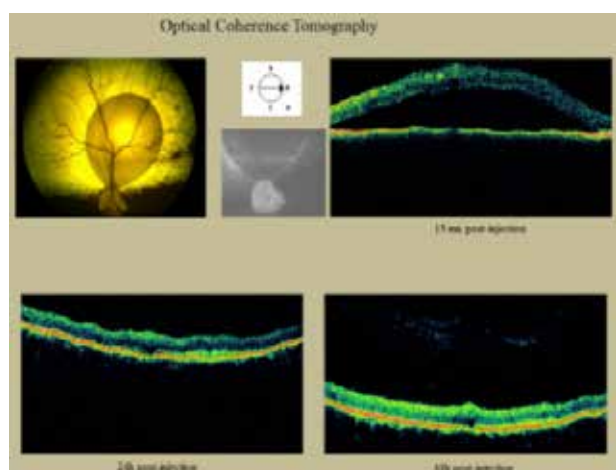
un avantage considérable en termes de logistique pour certains pays. C'est un petit virus de 25 nanomètres, comparé au VIH six fois plus gros.

En 1988, avec Jean-Michel HEARD à l'Institut Pasteur, nous avons démontré, chez les souris, qu'avec une seule injection par voie intraveineuse d'AAV codant pour le gène d'érythropoïétine nous pouvions contrôler le taux d'érythropoïétine.

Cela avait beaucoup intéressé les cyclistes du Tour de France

En 1999, il y a eu des premiers essais sur des races de chiens spontanément hémophiles. L'équipe de Katherine A. HIGH, à Philadelphie, a montré qu'une seule injection par voie intraveineuse d'un vecteur AAV codant pour le gène du facteur manquant, permettait son expression pendant plusieurs années. Une maladie grave était ainsi transformée en maladie à phénotype modéré, permettant aux chiens de survivre.

Plus récemment, nous avons appliqué cette thérapie avec vecteurs dérivés de l'AAV aux maladies génétiques de la rétine en collaboration avec le service d'ophtalmologie de l'hôpital de Nantes, dirigé par Michel WEBER.



Considérant la vue en coupe par OCT ci-dessus, la rétine avec les photorécepteurs en haut de la coupole, en bas se situe l'épithélium rétinien pigmentaire. Notre objectif est d'apporter le gène dans l'épithélium rétinien pigmentaire, la couche

qui est en bas.

La richesse de la virologie nous a donné des variantes AAV qui intègrent uniquement soit les cellules du bas soit les photorécepteurs en haut. Nous l'avons découvert par hasard ! Il existe des chiens Briards spontanément aveugles en raison d'un déficit d'une protéine de l'épithélium rétinien pigmentaire. Nous avons pu montrer qu'après injection du gène de la protéine déficiente avec le vecteur AAV adéquat, ces chiens ont récupéré l'activité électrique de la rétine et la vue.

En 2004, grâce à cette preuve de concept, nous avons pu, pour la première fois, envisager de mettre en place un essai clinique de phases I/II à Nantes.

Pour cela, il a fallu :

- trouver les ressources nécessaires soit, 5M€, auprès de l'AFM;
- faire une pré-soumission auprès de L'ANSM (aujourd'hui Afssaps);
- préparer les lots précliniques en 2008 pour l'étude toxicologique et de bio-distribution;
- construire un bâtiment pour préparer les médicaments;
- produire le lot clinique avec un financement PHRC;
- soumettre notre dossier à l'ANSCM.

L'autorisation a été obtenue le 15 juin 2011. Nous avons injecté neuf patients (trois cohortes). Les deux premiers de la cohorte 1 étaient complètement aveugles. Le premier a été injecté le 10 octobre 2011. Le chirurgien, Michel WEBER, après avoir repéré une zone malade, plante l'aiguille juste pour traverser les photorécepteurs mais sans aller de l'autre côté et introduit le vecteur. Pour ce geste chez un patient, ce sont 10 ans d'expertise de Michel WEBER acquise avec les chiens et les singes.

Aujourd'hui, l'essai clinique est terminé. Sur les neuf patients, sept veulent absolument avoir une injection dans le deuxième œil car ils veulent éviter qu'il continue de dégénérer. L'ANSCM nous avait donné une autorisation pour un seul œil, le plus malade.



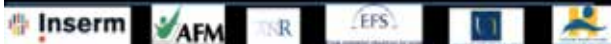
Tous les patients injectés utilisent seulement l'œil traité et non plus l'œil non traité. Pour certains d'entre eux, il existe véritablement une récupération partielle et un meilleur confort de vie. C'est extrêmement encourageant. Nous avons décidé de mettre en route une deuxième campagne de production pour injecter le deuxième œil.

Deux chiens atteints de maladie du photorécepteur (la partie en haut) sont disponibles. Pour l'un, la maladie touche d'abord la vision diurne, puis la vision nocturne. Pour l'autre, c'est l'inverse.

Ce dernier a été injecté avec un vecteur dérivé de l'AAV pour lui apporter le gène manquant. Nous avons injecté un seul œil après avoir vérifié qu'il était bien aveugle.

Ces essais ont lieu dans un bâtiment construit spécialement car nous utilisons des organismes génétiquement modifiés. C'est un édifice très particulier unique en Europe.

Sur le film projeté, on distingue qu'au départ il est complètement aveugle, il cherche son chemin en se cognant partout. Deux mois après le traitement, nous lui avons fait faire le même trajet en changeant l'emplacement des obstacles. Cette fois-ci, nous avons masqué l'œil aveugle pour tester l'efficacité du traitement. De toute évidence, il va mieux, il est bien plus à l'aise, faisant le parcours en courant.



Ce résultat a provoqué une forte émotion dans l'équipe. Cela faisait des années que nous travaillions pour atteindre ce résultat,

raconté ici en quelques minutes. Cela nous a encouragé à traiter rapidement des patients ! Le laboratoire a créé une start-up à partir de ces résultats avec l'aide de l'INSERM et des autres tutelles précédemment mentionnées. Nous avons déposé des brevets. La société créée va maintenant développer ce produit au stade clinique.

Ce deuxième produit est en préparation, un troisième est en projet.

L'œil a un avantage considérable : il faut peu de produit, l'équivalent d'un dé à coudre pour traiter un œil. Produire l'équivalent d'une dizaine de dés à coudre c'est une capacité accessible.

Par contre, pour des affections comme la myopathie de Duchenne où tous les muscles du corps y compris le cœur, le diaphragme sont impactés, il faut toucher tout le corps, nous ne savons pas faire.

C'est là que les baculovirus peuvent être utiles.

Les cellules d'insectes poussent très bien dans des bioréacteurs. La photo ci-dessous représente un bioréacteur de 200 litres.



Les baculovirus décrits ce matin par Clément Gilbert infectent ces cellules d'insectes. Nous les avons utilisés pour amener les fonctions auxiliaires nécessaires à la production de l' AAV.

A ce propos, nous nous sommes également posé la question de savoir si, dans nos

La dernière génération de médicaments dérivés des virus

produits, nous n'embarquons pas du génome externe résultant de transferts présentés par Clément Gilbert.

Grace à cette technologie nous sommes capables aujourd'hui de produire des quantités importantes de ces AAV.

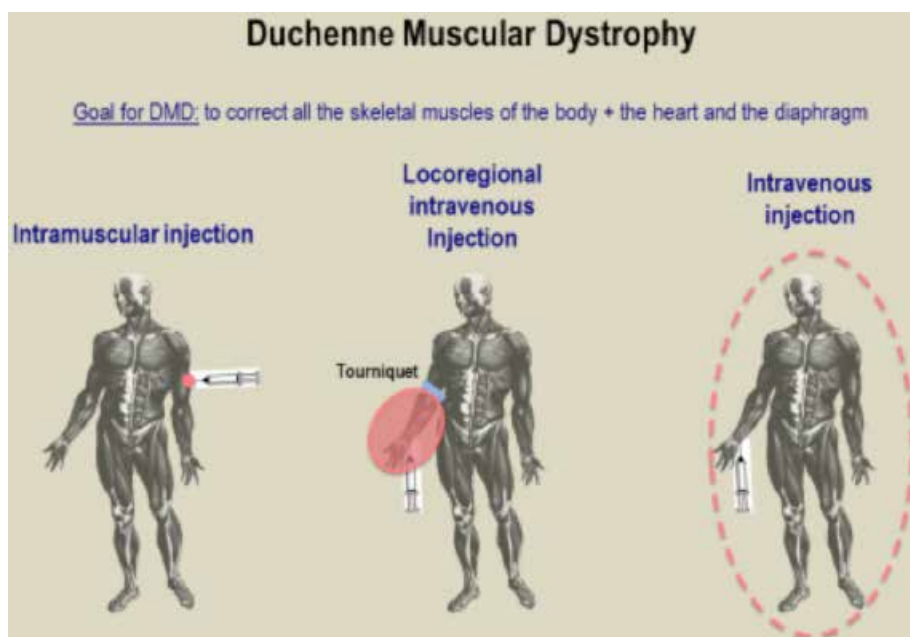
Nous avons pu ainsi être en mesure d'aborder le transfert chez les myopathes.

La voie intramusculaire n'est pas envisageable

car il faudrait faire des centaines d'injections pour toucher tous les muscles ! Nous avons abandonné cette voie intramusculaire qui était déjà beaucoup utilisée par ailleurs et qui ne nous semblait pas la plus appropriée.

Sur le schéma suivant sont représentées les 3 approches

À gauche, c'est l'approche intramusculaire



locale qui a été déjà beaucoup utilisée.

Au centre l'injection intraveineuse locorégionale prudente dans l'avant-bras des patients que nous avons expérimentée pour la première fois chez l'homme.

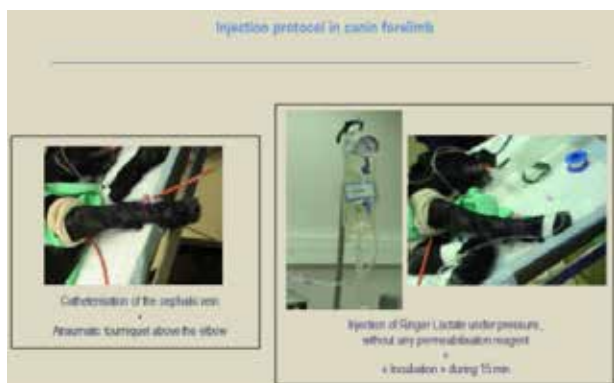
Elle a été effectuée sur des patients en chaise roulante, qui ne peuvent plus bouger, mais dont il reste néanmoins la fonction motrice des avant-bras leur permettant par exemple d'accéder à Internet et de manœuvrer leur fauteuil électrique.

Elle présente plusieurs avantages : l'exposition est limitée par rapport à l'ensemble du corps, et elle répond à un besoin du patient. L'étape suivante, sera le schéma de droite, la voie intraveineuse.

Le gène de la dystrophine à transférer possède une taille importante de 14Kb. L'AAV étant un petit virus, il ne peut embarquer qu'un

gène de 5Kb maximum. Pour pallier à cette difficulté, nous avons utilisé la technique de saut d'exon, permettant d'amener dans l'AAV des séquences qui vont se positionner sur l'ARN. Elle vont forcer la machinerie à sauter la partie du transcrit qui porte la mutation. Cela permet de rétablir le splicing en phase et de générer une dystrophine plus courte, mais fonctionnelle. Cette machinerie rentre dans un AAV, permet de faire du saut d'exon in situ et en théorie de rétablir la fonction manquante.

En préalable, sur des chiens spontanément atteints de cette maladie, nous avons développé une méthode pour transférer le gène uniquement dans la patte avant. Nous avons opéré avec un panel comprenant un chien normal, un chien malade qui n'est pas traité et un groupe de chiens ayant reçu la dose la plus forte de nos vecteurs AAV par voie locorégionale.



Le rétablissement de la dystrophine dans cette zone perfusée a été quasi-complète.

Ce résultat a été le fruit d'une collaboration entre l'Institut de Myologie, le Généthon à Évry et nous à Nantes. C'est un groupe de 90 personnes qui s'est focalisé sur cette maladie.

Nous avons obtenu la preuve du bénéfice thérapeutique grâce à un dispositif mesurant la force du chien mis au point à l'Institut de Myologie par Jean-Yves HOGREL. Il a pu montrer que le traitement apportait une récupération de force.

Suite à ce résultat, nous devrions injecter, avant la fin de l'année, les premiers patients sélectionnés. Le lot clinique a été produit et nous nous préparons.

Une fois que nous aurons fait cela, il faudra anticiper la phase suivante au cours de laquelle nous injecterons le produit avec un cathéter dans le pli du bras.

Pour cela, il faudra une nouvelle fois mener des études précliniques.

En préalable nous avons exploré le potentiel de cette voie systémique sur des chiens GRMD de notre groupe, l'AAV étant produit avec le système baculovirus :

Sur le film présenté, un jeune chien GRMD typique atteint de la maladie et non traité n'a absolument pas l'énergie ni la force de franchir l'obstacle, de le sauter. Notre colonie de chiens est très homogène, tous sont malades, ont le même phénotype et meurent très tôt. Si on abaisse l'obstacle et il est suffisamment motivé pour le franchir avec le train avant seulement.

Nous avons traité l'un de ses frères et en voyant l'efficacité du résultat, nous avons pensé qu'il n'était peut-être pas malade. Nous avons donc procédé à une nouvelle analyse génétique pour confirmer la présence de la maladie.

La comparaison des deux frères est probante. Celui qui n'a pas été traité a déjà pris un peu d'âge. Le poil est typique, les pattes arrières d'abord très serrées, élargissent leur polygone de sustentation pour pouvoir tenir debout ; il ne peut pas franchir d'obstacle. Il ne peut pas courir car le cœur ne suit pas. Il est d'ailleurs décédé très tôt. Le chien traité a la rigidité typique des chiens myopathes, mais il fait des choses qu'un chien myopathe ne fait jamais, il se met sur ces pattes arrières. Nous n'avons jamais vu cela, c'était un résultat incroyable, seulement après une seule injection.

Comme nous pensions qu'il s'agissait d'un chien occasionnel, nous en avons traité d'autres et obtenu le même résultat.

Nous sommes maintenant à deux ans post-injection et cela dure, alors qu'en temps normal, les chiens myopathes meurent entre 8 et 10 mois.

Voilà où nous en sommes pour le traitement de la myopathie de Duchenne.

Cela ne veut pas dire que nous avons un médicament, mais nous pourrions bientôt proposer cette méthode aux humains.

L'autre particularité de l'AAV est de pouvoir traverser les synapses ; ce qui en fait un moyen très intéressant pour traiter les maladies du système neurologique, notamment dans l'amyotrophie spinale. Des essais chez les enfants sont pratiqués aux États-Unis. Ils ont injecté 7 enfants atteints d'amyotrophie spinale de type 1 par voie intraveineuse dès l'âge de 3 à 6 mois. Ces enfants sont normalement sous ventilateur au bout d'un an. Dans ces essais, ils ne sont pas sous ventilateur et leur état a l'air de s'améliorer. Il est bien trop tôt pour tirer des

La dernière génération de médicaments dérivés des virus

conclusions définitives.

Un dernier aspect : **l'expression de ces gènes transférés peut être modulée.**

Si on administre à la souris de la tétracycline, cela active le promoteur et permet l'expression de l'érythropoïétine. Si l'on retire la tétracycline de l'eau de boisson, l'expression du gène de l'érythropoïétine s'éteint.

Nous avons conduit la même expérience sur les singes par injection intramusculaire de l'AAV avec le gène de l'érythropoïétine. Ces singes ont été suivis pendant 11 ans et en septembre de chaque année, on leur donnait un pruneau contenant la tétracycline pendant quelques jours et l'expression de l'érythropoïétine s'élevait.

Cette expérience n'est pas destinée aux cyclistes français, mais permet de répondre affirmativement à la double question concernant la persistance et la régulation de transgènes :

- Un génome apporté par un AAV qui ne s'intègre pas dans les chromosomes restant complètement à l'extérieur persiste dans le temps.
- Il peut être parfaitement régulé.

Voilà la situation. C'est l'une des médecines de demain. Les essais cliniques foisonnent. Ils pourront répondre à certaines indications. C'est une œuvre passionnante pour laquelle je suis heureux de témoigner auprès de vous.

Parmi l'ensemble des personnes qui participent à ces travaux, j'aimerais citer en particulier trois personnes : Laurent SERVET, médecin à l'Institut de Myologie, Fulvio MAVILIO, directeur scientifique du Généthon et Caroline LE GUINER de Nantes qui a mené un travail sur la myopathie de Duchenne.

Je vous remercie.

(Applaudissements).

Jean-Pierre DECOR.- Merci Philippe, pour cette présentation passionnante des progrès accomplis et des perspectives ouvertes par

la thérapie génique.

Y a-t-il des questions dans l'auditoire sur cet exposé avant de démarrer la table ronde ?

Un intervenant.- A votre connaissance, des essais sont-ils expérimentés sur des cellules germinales ?

Philippe MOULLIER.- Toute technologie qui apporte un peu de lumière apporte aussi sa partie sombre. Je suis certain que des gens ont ou vont penser à l'usage malveillant de cette technologie. Ainsi, j'ai eu des visites de cyclistes professionnels dans mon laboratoire, qui arrivaient avec une excuse, mais qui venaient se renseigner. Ils étaient prêts à faire n'importe quoi.

Pour répondre à votre question, il y a certainement des gens qui vont faire ce genre de choses. Ils ne vont sans doute pas utiliser les AAV parce que cela ne s'intègre pas.

Quand vous préparez un essai clinique et que vous déposez cette demande auprès de l'Agence du médicament, vous devez apporter des évidences expérimentales qu'il n'y a pas d'intégration. Nous avons récupéré le sperme des chiens sexuellement matures auxquels nous avons injecté des doses importantes d'AAV. Cette maladie n'affecte que les mâles, et nous avons pu apporter la preuve que l'on ne trouve pas d'AAV dans les semences.

Les gens sérieux vérifient ce point.

Un intervenant.- Qu'en est-il des réactions immunitaires ? Pouvez-vous administrer à plusieurs reprises ces « adeno associated viruses » ou êtes-vous limité dans le nombre d'administration pour des raisons immunologiques ?

Philippe MOULLIER.- Quand vous injectez de l'AAV, les patients sont sélectionnés en partie pour leur séronégativité pour le sérotype utilisé. Dès lors qu'on les a exposés au vecteur, ils deviennent séropositifs et neutralisants. On ne peut pas concevoir une deuxième injection.

Les patients qui ont reçu de l'AAV pour



l'hémophilie ou d'autres pathologies par voie systémique ont une expression permanente du transgène après une seule injection. A priori, on n'est pas confronté à effectuer une nouvelle injection. Mais il n'est pas exclu que dans d'autres cas, on soit obligé de réinjecter. Avec la dose que nous injectons, c'est totalement neutralisant. C'est là que les plasmaphères peuvent être indiquées pour diminuer la présence de facteurs neutralisants. Nous avons déjà entrepris des études chez les macaques pour voir si cela pouvait fonctionner. Cela n'a pas encore été exploré chez l'homme.

Ghenima CHOUBANE.- Je travaille dans la recherche médicale en immunologie. Lorsque j'étais en formation, il y eu l'expérience faite à Necker concernant les DICS-X. Si mes souvenirs sont bons, 5 ou 7 enfants avaient un déficit du gamma-C de IL-2 ou IL-4.

Le gène manquant, s'est malheureusement inséré à proximité d'un proton oncogène ; ce qui a déclenché des leucémies chez certains de ces enfants. Je me rappelle que le chercheur nous avait expliqué qu'il était question d'ajouter des gènes suicides, si ce genre d'expérience était renouvelé pour éviter le développement de toute tumeur.

Y a-t-il eu une suite à cette expérience ou d'autres essais ?

Philippe MOULLIER.- D'autres essais ont bien eu lieu dans cette indication, celle d'un déficit en ADA (adénosine désaminase) et bien d'autres.

Mais la nature nous a aidés. Avec le VIH, nous avons la face sombre et la face claire. Nous avons exploité la phase claire pour en faire un vecteur qui n'a pas la particularité de celui auquel vous faites référence. Un vecteur rétroviral dérivé de la souris avait systématiquement tendance à s'insérer à proximité des promoteurs et à pouvoir les transactiver ; d'où la leucémie déclenchée chez trois enfants, dont une a été malheureusement fatale.

Les vecteurs dérivés du VIH ne s'intègrent pas dans cette zone extrêmement sensible.

Dans les nombreux essais qui ont été pratiqués, ils n'ont pas d'impact là où ils s'insèrent. Les vecteurs VIH sont appliqués dans de nombreuses pathologies avec beaucoup de succès. Nous ne sommes plus confrontés à ce problème d'intégrer un gène suicide comme le gène T4 de l'herpès. Cela a finalement été abandonné. Mais il n'est pas exclu qu'on le réutilise un jour pour d'autres indications.

Ghemina CHOUBANE.- L'utilisation de gènes suicides est spécifique à la recherche anti-tumorale.

Philippe MOULLIER.- Je n'en ai pas parlé car c'est l'adénovirus.

Ghemina CHOUBANE.- Je vous remercie.

Alain COLENO.- Vos essais sur l'œil correspondent-ils à un décollement de la rétine ou d'une membrane ?

Le résultat a-t-il contribué à recoller l'ensemble le long de la rétine ?

Si j'ai bien compris, avec ce type de vecteur il n'y a pas de problème d'immunité. Vous l'avez pointé quand vous avez dit que les patients qui ont subi une injection dans un œil voulaient une injection dans l'autre œil.

Philippe MOULLIER.- En effet, on peut renouveler une injection car l'œil est un endroit immunoprivilégié. L'espace rétinien est un espace protégé si l'injection est bien faite. Si elle fuit dans le système périphérique, une immunité se déclenche. Le chirurgien est responsable de la présence ou non d'anticorps neutralisants à la suite de l'injection. Le nôtre, Michel WEBER, est excellent. Il n'y a donc pas formation d'anticorps neutralisants. Nous pouvons proposer une injection au deuxième œil.

Nous procédons à un véritable décollement de la rétine. Certains chirurgiens en France, dont Michel WEBER, font des translocations de rétine ; ils décollent toute la rétine dans certaines pathologies comme la DMLA. Il repère les zones qu'il considère être malades et va spécifiquement injecter les zones autour qui sont encore saines car une fois qu'un photorécepteur est mort c'est définitif.

La dernière génération de médicaments dérivés des virus

Il faut donc cibler les zones vivantes pour les préserver.

Gérard ORTH.- Il me semble que Pierre CHARNOT à l'Institut Pasteur développait des vecteurs non intégratifs. Dans ce cas, au moins un de leurs inconvénients semblerait levé.

Philippe MOULLIER.- Vous avez raison sur le fond, les non intégratifs existent aujourd'hui. Mais ce que vous venez de dire est intéressant parce que nous avançons dans la science de façon dogmatique et on a tendance à simplifier les choses. Quand je dis par exemple que l'AAV ne s'intègre pas si on explore en détail, on va trouver de l'intégration. Quand Pierre dit que le VIH non intégratif ne s'intègre pas, si on va regarder avec la technologie de l'Illumina dont Clément GILBERT parlait ce matin, on va trouver de l'intégration du vecteur.

Gérard ORTH.- Dans le cas de l'AAV, il y a une spécificité d'intégration plus grande qu'avec d'autres virus. Est-ce que je me trompe ?

Philippe MOULLIER.- L'AAV sauvage est équipé de tout ce qu'il faut pour s'intégrer. Son action est de s'intégrer dans un petit endroit silencieux, un locus particulier.

Gérard ORTH.- Pour finir de rendre hommage au virus utilisé en tant que médicament au sens large, il faut mentionner les vaccins qui utilisent les vecteurs viraux pour la prévention et la thérapie. Cela élargit le cadre des bienfaits que l'on peut tirer du virus.

Philippe MOULLIER.- Vous avez raison de le souligner. Ébola par exemple fait l'objet de vaccin à base d'adénovirus. On peut utiliser l'adénovirus pour fabriquer des vaccins.

Jean-Pierre DECOR.- Merci, Philippe pour cette rétrospective et ces développements très prometteurs présentés d'une façon très claire.



Modérateur : Dr Jean-Pierre DECOR



Jean-Pierre DECOR.- Nous allons procéder dans l'ordre chronologique suivant :

- les caractéristiques des virus géants;
- les relations bactéries - virus;
- les différents transferts possibles;
- les thérapies : bactériophages, vecteurs en thérapie génique;
- On pourra également évoquer l'oncothérapie, c'est-à-dire la destruction sélective de cellules cancéreuses par des virus.

Georges FREYSSINET.- Ma question porte sur les protéines spécifiques des Mégavirus. Il y a un ensemble de protéines particulières que l'on ne retrouve pas dans d'autres organismes. Y a-t-il des protéines communes à tous ces virus et qui leur seraient spécifiques ?

Jean-Michel CLAVERIE.- Il y a une notion de « gène noyau commun » (i.e. « core

genes ») à toute une famille de virus comme dans les virus normaux. Lorsqu'on découvre d'autre virus appartenant à cette même famille il y a des gènes communs et des gènes différents qui peuvent être orphelins de famille, car on ne les retrouve pas dans les virus ou dans tous les êtres cellulaires que nous connaissons actuellement. Les gènes communs pourraient appartenir à l'ancêtre commun de toutes ces familles de virus.

Par exemple entre Mimivirus et Mégavirus, 50 % de protéines sont communes et 50 % de protéines restent différentes d'un virus à l'autre.

Clément GILBERT.- D'où viennent ces gènes dont l'origine n'est pas connue ? Proviennent-ils d'organismes qui ne sont pas encore séquencés ou sont-ils spécifiques à ces virus ?

Jean-Michel CLAVERIE.- J'avais répondu à un journaliste en disant que ces virus

pourraient aussi bien venir de Mars ou d'ailleurs. Cela avait été repris dans le contexte de la panspermie comme une réponse sérieuse. D'ailleurs c'est peut-être vrai puisque la panspermie est revenue à la mode !

D'où viennent ces gènes ? Je vous ai montré une hypothèse possible.

Quand je dis que ces protéines ne ressemblent à rien, cela signifie qu'elles ont très peu d'homologues dans les grandes bases métagénomiques, avec l'ADN que l'on trouve au hasard. Elles n'ont aucune homologie connue. A contrario, quand on séquence une nouvelle bactérie même extrêmement exotique, seuls 10 % de ses gènes ne ressemblent pas à grand-chose sachant que nous connaissons beaucoup de bactéries et de très nombreux eucaryotes.

On peut donc dire que si elles proviennent d'un ancêtre, il n'est aucunement représenté dans les bases de données. Soit il vit dans des endroits que l'on n'a jamais explorés, soit il a disparu de la planète ce qui est plutôt notre hypothèse.

Une dernière possibilité serait l'existence d'une génération de gènes de novo par un mécanisme moléculaire que nous ne connaissons pas. Il faudra bien un jour l'envisager pour expliquer la formation des 2 000 premiers gènes de la création...

S'agit-il de virus qui ont une façon moléculaire de générer des gènes ? Il est difficile d'imaginer qu'un virus créerait des séquences au hasard, qu'il attendrait au hasard qu'une phase ouverte de lecture se crée, puis que la protéine ainsi créée de novo, ne serve d'abord à rien puis qu'elle se trouve une fonction et que celle-ci soit bénéfique pour le virus pour être finalement fixée par l'évolution !

Cela fait quand même beaucoup de coïncidences. Si c'était ainsi, la vision darwinienne, en tout cas pour les virus, serait totalement fautive !

Maxime SCHWARTZ.- Si ces protéines n'ont pas d'homologie avec les protéines

connues, a-t-on quelques idées pour certaines d'entre elles ?

Jean-Michel CLAVERIE.- Pour expliquer qu'elles n'ont aucune homologie, des évolutionnistes conservateurs prétendent, que du fait que les virus mutent très vite, ce sont des protéines possédées par les ancêtres, mais qui ont tellement muté au point de ne plus reconnaître des homologies de séquences.

Leurs structures 3D aussi ne ressemblent à aucune structure connue.

Chantal ABERGEL a réalisé plusieurs structures de ces protéines qui n'avaient aucune homologie avec des protéines connues, leur repliement dans l'espace était totalement original.

Ainsi quand aucune homologie de séquence n'est reconnue, il n'y a aussi aucune homologie de structure.

Notre prochain objectif est de développer la génétique de ces virus pour arriver à connaître la fonction de ces protéines.

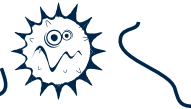
Ces virus manipulent les mêmes éléments de base que la cellule. Il est également possible qu'ils les manipulent dans un réseau métabolique totalement différent.

Nous avons déjà des évidences qu'il y a dans les cellules infectées des métabolites dont nous ne savons rien, que nous n'avons jamais vus et qui apparaissent seulement dans ce type de cellule.

Ils ont peut-être la possibilité de faire de l'ATP, des nucléotides d'une manière totalement différente que ceux connus actuellement. Cela prendra un certain temps car nous avons à trouver la fonction d'environ 1 000 gènes !

D'abord, nous espérons que le système CRISPR-Cas va fonctionner. Nous sommes en train de travailler sur ce sujet. Cela va être effectivement très long, car il faut reprendre la physiologie à zéro.

Gérard ORTH.- Quand vous évoquez l'évolution régressive pour expliquer l'émergence de Mimivirus, vous impliquez



que les êtres eucaryotes qui ont donné naissance à ces virus savaient utiliser ces protéines pour une fonction bien déterminée. Leur usage s'est peut-être perdu, en devenant parasites de cellules. Implicitement, une évolution régressive suppose que les protéines qui subsistent avaient une fonction avant la régression.

Jean-Michel CLAVERIE.- Le terme d'évolution régressive veut simplement dire qu'avec une entité organisée pour survivre à l'intérieur d'une cellule, il n'y a jamais réversion. Nous ne connaissons pas de parasite qui soit redevenu de nouveau indépendant. C'est une espèce de roue à cliquet.

Cela s'explique par le fait qu'à partir du moment où un autre peut subvenir à une fonction, il n'est pas vraiment besoin de la garder. C'est même bénéfique pour le parasite, puisque le gène n'a plus à être synthétisé et le génome à être conservé. C'est parfaitement classique : on est parasite, donc on perd des fonctions.

Ces fonctions étaient-elles identiques ou comparables à celles connues dans l'hôte ou étaient-ce des fonctions totalement différentes ?

Sur la question de l'évolution régressive, il est évident que tous les gènes actuels sont encore nécessaires et que tous les gènes perdus devaient probablement être nécessaires, du moins à l'ancêtre de ces virus.

L'origine est-elle la même que celle des phylums normaux ou est-ce la manifestation de fossiles de phylums totalement différents qui pourraient même ne pas avoir la même origine que les trois autres ? Nous sommes en plein débat. Ce ne sera pas résolu avant pas mal de temps. Nous continuons à chercher de nouvelles familles, de nouveaux virus, pour englober la diversité.

Allons-nous finir par trouver des virus qui ont 15 aminoacyl-ARNt synthétase et d'autres 19, quelques protéines ribosomales, pourquoi pas ? Nous continuons cette exploration.

Il n'y a qu'en ayant beaucoup d'exemples d'un même objet que nous finirons par en sentir l'essence.

Pour prendre une image : soit une voiture rouge, avec quatre roues, si une autre est verte, c'est aussi une voiture la couleur n'est pas nécessaire. S'il n'y a que trois roues, c'est encore une voiture...

Nous n'en connaissons pas assez pour bien comprendre l'essence de ces nouveaux objets que sont ces virus géants.

Antoine DANCHIN.- Il vient de paraître un article très détaillé sur l'analyse de 646 000 protéines de Swiss-Prot, essentiellement d'eucaryotes. L'article s'intitule : « le protéome noir ». Le résultat est qu'entre 44 et 54 % des protéines présentes chez les eucaryotes et dans Swiss-Prot, ont une vraie structure qui ne ressemble à rien de connu et une fonction inconnue. Quelle est la différence entre ce « dark proteome » et les protéines particulières de ces virus ?

Jean-Michel CLAVERIE.- Je pense qu'il n'y en a aucune. Cela nous montre qu'à une certaine époque (peut-être pré-LUCA), il s'est passé beaucoup de choses. Contrairement à ce que nous pourrions penser, beaucoup ont laissé des traces que nous commençons seulement à repérer. Il y a une espèce de phylum dominant qu'il est possible de retracer jusqu'à l'origine, qui est LUCA. Il y a peut-être des phylums accessoires parallèles qui ont laissé des traces par-ci par-là, que nous ne retrouvons que dans certaines sous-familles du phylum dominant.

Nous ne connaissons pas encore tous les environnements. Il existe maintenant des bactéries extrêmement petites trouvées dans des aquifères profonds. Elles ont de l'ADN, un génome, mais manquent quasiment de tout. Nous ne savons absolument pas comment elles peuvent se reproduire. Il n'y a même pas la place de mettre un ribosome.

Nous sommes loin d'avoir compris tout ce qui s'est passé à partir du milliard d'années d'évolution de la vie sur terre. Il a pu se

passer beaucoup de choses, dont nous commençons seulement maintenant à trouver des traces.

Antoine DANCHIN.- Cela peut-il rester dans la même catégorie que les ancêtres des eucaryotes ?

Jean-Michel CLAVERIE.- Oui, mais ces ancêtres peuvent être multiples. Nous faisons des arbres sur des choses communes. À la fin, nous finissons toujours par arriver à un ancêtre commun.

Sur le Pandoravirus, si nous regardons la classification de ce virus en nous basant uniquement sur des éléments communs à ce que nous connaissons, vous avez un tiers de bactéries, un tiers d'eucaryotes et un tiers de virus. L'essence de ce virus est ce qui n'est pas connu.

Antoine DANCHIN.- C'est la même chose chez l'homme : il n'y a pas d'Adam, il n'y a pas d'Ève. Nous sommes mélangés de Neandertal, donc cela peut être pareil. Il n'y a pas de LUCA, mais plutôt une population...

Jean-Michel CLAVERIE.- Absolument, il y a beaucoup de choses qui se sont passées avec des métabolismes très différents, dont certaines traces sont restées plus ou moins présentes dans certains organismes.

Jean-Pierre DECOR.- Après votre intervention, la question sur l'origine des virus restant ouverte, qu'en est-il pour la question subsidiaire : sont-ils vivants ?

Jean-Michel CLAVERIE.- C'est une question qui reste également sans réponse, car nous avons même du mal à définir ce qui est appelé « être vivant ».

En fait, les amibes sont des usines pour la multiplication des virus mais leur rôle fondamental est la fabrication d'une sorte de boîte : la capsid.

Nous savons que des virus fonctionnent très bien avec deux ou trois gènes.

Quand il a été dit qu'un virus avait 1 200 gènes, à quoi cela peut-il bien lui servir lorsque des virus avec trois fonctionnent très

bien ? En général, plus ils sont petits, plus ils sont pathogènes. Cela a fait réfléchir.

Le génome du virus n'est pas en liaison avec la « boîte ». Le virus a été découvert par le filtre de Chamberland. A ce stade le virus était inerte. Le concept de virus ne se rattache pas à la « boîte », mais à ce qui se passe une fois que le virus est dans la cellule. Ces 1 000 gènes ne sont pas nécessaires pour faire la « boîte ». Vous avez beaucoup moins de protéines que cela dans la « boîte », mais vous avez besoin de 1 000 gènes pour recréer cette « boîte » à chaque fois quand vous allez infecter une cellule.

Quand les virus sont sous leur forme cellulaire, ils sont vivants.

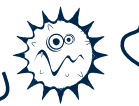
Pour faire un parallèle, prenez un spermatozoïde ou un ovule, qui n'ont aucune activité spécifique, les spermatozoïdes savent au moins nager ! Pourtant, ils ont le même génome qu'un homme. Imaginez, que pour la première fois, vous fassiez la séquence d'un spermatozoïde ou d'un ovule et vous découvriez qu'il y a 3,5 milliards de nucléotides et 27 000 gènes. Vous allez vraiment vous demander : à quoi cela sert d'avoir 27 000 gènes ? En fait, cela sert à faire un homme.

Quand vous regardez la « boîte » d'un virus et vous trouvez 1 000 gènes, c'est étonnant, mais le paradoxe est qu'il doit rentrer dans une cellule pour se reconstruire. Quand il est sous cette forme cellulaire, il est totalement vivant.

Vous avez différents niveaux de vie pour les virus, dépendant du nombre de gènes qu'il faudrait leur donner pour qu'ils puissent se répliquer de manière totalement indépendante.

Il n'y a pas de question pour moi : les virus sont vivants.

Jean-Pierre DECOR.- En résumé on peut dire que l'origine des virus reste une inconnue ; qu'il n'y a pas de limitation pour leur taille, qu'ils peuvent comporter un nombre très important de gènes et qu'ils



sont vivants à l'intérieur d'une cellule.

Bernard BODO.- Connait-on le nombre de virus avec une nomenclature comme pour les espèces botaniques ou animales ? Chez les bactéries, il m'a été dit qu'il avait été identifié 11 000 espèces. Beaucoup sont connues par l'approche métagénomique, mais avons-nous une idée du nombre de virus avec un nom et du nombre de ceux connus uniquement par une approche génomique ?

Jean-Michel CLAVERIE.- C'est une question cléricale. Il se trouve que je suis membre de l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). C'est une discussion que nous allons avoir à Cambridge en février. Nous ne savons plus comment classer les virus. À quel moment faut-il leur donner un nom ? Quand vous ne voyez qu'un gène ou deux en métagénomique, faut-il leur donner un nom ? Faut-il l'avoir isolé dans un tube ?

A la question combien de virus dont nous connaissons un peu quelque chose ; je répondrai 10 000 à 20 000. Par ailleurs Laurent DEBARBIEUX vous dira que jamais n'est retrouvé le même bactériophage...

Bernard BODO.- Chez les bactéries, nous ne savons en cultiver que 1 %. Cela laisse des univers.

Laurent DEBARBIEUX.- Il y a une diversité impressionnante. En laboratoire, si nous prenons un échantillon environnemental pour isoler des bactériophages capables d'infecter cette bactérie, nous pensons toujours trouver le même, voire un seul. En fait, nous nous retrouvons avec des éléments extrêmement proches, mais jamais 100 % identiques.

Bernard BODO.- Donc il y a spécificité d'interaction ?

Laurent DEBARBIEUX.- Oui. Il est possible d'avoir la même « boîte », des protéines pour faire les capsides à 100 % identiques. Après, le reste du génome nécessaire à la piraterie de la machinerie cellulaire est différent. Si nous considérons la capsid, c'est le même virus. Si nous examinons le reste du génome,

c'est un virus différent. Pour la classification, nous sommes face à un vrai problème.

Bernard BODO.- Certains de vos collègues pensent que le noyau des eucaryotes a pour origine le Mimivirus.

Jean-Michel CLAVERIE.- Je fais partie des personnes qui l'ont pensé à une certaine époque.

Je vais vous répondre par une litote : Que sait faire le noyau indépendamment de la cellule ? Il sait transcrire, répliquer de l'ADN. Il ne fait surtout pas la traduction. Il laisse faire le cytoplasme. Que fait un virus ? Il sait faire la réplication de l'ADN, la transcription et il laisse la traduction au cytoplasme.

Sur le plan conceptuel, nous avons l'impression qu'un noyau est une espèce de parasite du cytoplasme au même titre qu'un grand virus à ADN. C'est une façon très philosophique de répondre à votre question.

Il y a de nombreux arguments qui montrent qu'un grand nombre d'appareillages semblent avoir été inventés par des virus. Il est possible même que l'ADN ait été inventé par les virus dans un monde ARN...

Bernard BODO.- Si l'on considère la cellule végétale : la photosynthèse est faite par le chloroplaste qui est à l'origine une cyanobactérie. Il est possible d'imaginer beaucoup de fusions entre organismes.

Jean-Michel CLAVERIE.- Il est possible d'imaginer que l'ADN aurait été inventé par des virus pour protéger leur génome des RNAses dans un monde ARN. Ce n'est pas très compliqué sur le plan métabolique.

Il est possible d'imaginer que l'ADN est au départ une modification de l'ARN, ce type d'objet étant resté coincé dans la cellule qu'il infectait et que, finalement, la cellule en a tiré profit. Plutôt que de rester avec son génome ARN, elle a pris le génome ADN, en plusieurs milliards d'années.

Cela fait partie des choses qui sont raisonnables, mais simplement très difficiles à démontrer.

Jean-Pierre DECOR.- L'exposé suivant a porté sur les relations bactéries/virus. L'an dernier, nous avons appris que nous avons un microbiote tout à fait spécifique. Les virus cohabitent avec les bactéries dans ce microbiote et ils sont dix fois plus nombreux. Quelques-uns sont bactériophages, pas tous, vu qu'il nous reste quelques bactéries. Les virus au niveau de nos intestins sont-ils aussi spécifiques que nos bactéries ou est-ce du tout-venant ?

Laurent DEBARBIEUX.- Pour les bactériophages qui sont dans l'intestin, les approches métagénomiques sont assez peu informatives, à cause de la diversité génomique des virus. Nous pouvons seulement identifier quelques protéines proches des protéines déjà connues. Nous pouvons déterminer qu'une séquence vient d'un bactériophage, car cela ressemble à un fragment de capsid d'un bactériophage déjà décrit.

Si c'est un nouveau bactériophage, nous ne pouvons pas savoir à quoi se rattache cette séquence. Nous avons encore une vision très parcellaire du nombre de bactériophages présents.

Les données exposées ce matin ne sont basées que sur ce que nous avons réussi à identifier comme faisant partie des bactériophages. Cela ne représente qu'entre 1 et 10 % de la totalité des séquences obtenues.

Nous n'avons pas encore compris l'utilité de séquences génomiques dans ce type d'analyse. Nous sommes encore loin de pouvoir associer correctement la population des bactériophages à la population des bactéries qu'ils sont capables d'infecter.

Jean-Michel CLAVERIE.- L'origine du système CRISPR de défense des bactéries – dont les applications, je l'espère, vont nous permettre d'avoir un nouveau prix Nobel français - ne m'est pas claire. La plupart des attaques virales sont mortelles pour la bactérie. Seules les bactéries qui ont résisté ont pu bâtir leur système CRISPR, mais alors

comment ont-elles pu résister?

Du fait que nous ne retrouvons jamais pour les mêmes bactéries une attaque par le même bactériophage, quel est l'intérêt de ce système immunitaire?

La probabilité pour une même bactérie d'avoir à subir deux attaques successives d'un même bactériophage étant extrêmement faible, l'idée d'une origine évolutive du système CRISPR et de son utilité me pose question.

Laurent DEBARBIEUX.- Dans le système CRISPR, il n'est pas nécessaire d'avoir une grande séquence pour la reconnaissance. Nous pouvons en avoir une qui corresponde à une protéine de capsid des phages qui est conservée entre différents virus.

Quant à l'origine du système CRISPR, elle n'est pas encore bien définie. En effet, il peut exister un paradoxe : comment une bactérie peut-elle apprendre qu'elle doit se défendre contre le phage qui est en train de l'infecter ? Il faut que ce phage ne soit pas efficace.

L'acquisition de séquences de bactériophage captée par la bactérie pour l'intégration dans la région CRISPR nécessite que l'infection virale soit en fait abortive.

C'est un bactériophage défectueux, qui n'était pas capable d'aller au bout de son cycle infectieux qui peut donner l'opportunité à la bactérie de capturer l'élément qui va permettre à cette bactérie de se souvenir et de se protéger contre une future infection virale par ce type de bactériophage.

Maintenant, comment la bactérie choisit telle ou telle petite séquence ? Nous n'en avons absolument aucune idée aujourd'hui.

M. PHILIPPON.- Dans votre exposé, vous avez parlé de l'attitude de l'industrie. Peut-elle s'intéresser aux bactériophages dans les années à venir ?

Laurent DEBARBIEUX.- Je serais heureux que cela se fasse. Nous avons besoin de ce soutien aujourd'hui pour en faire une vraie thérapie et non pas simplement un traitement accessoire, dispensé au cas par cas et dans



des conditions qui ne sont pas forcément bien encadrées.

Quels sont les freins qui empêchent l'industrie de s'investir ?

Il y a eu, dans les années 1980, en Angleterre une série d'articles qui ont clairement démontré en expérimentation animale chez le veau et d'autres animaux de rente l'intérêt thérapeutique des phages pour traiter des infections bactériennes.

Ils n'ont pas donné lieu à des développements industriels.

À partir de 2005, un regain d'intérêt s'est manifesté. Des moyens plus importants de recherche ont été mobilisés vraisemblablement en raison des problèmes grandissant de résistance aux antibiotiques.

Nous insistons aujourd'hui sur l'approche thérapeutique par les phages car nous percevons la nécessité d'une alternative pour ne pas se retrouver face à une impasse totale.

Pourquoi l'industrie ne s'est pas encore mobilisée ? Est-ce pour des raisons de propriété industrielle ou de réglementation non encore établies ?

L'industrie a besoin d'avoir un retour sur investissement. Aujourd'hui, nous ne l'avons pas. Nous ne sommes pas dans un modèle économique qui le permette.

Le modèle économique sur lequel l'industrie pharmaceutique fonctionne est relativement bien défini. Développer des molécules, des produits ou des vecteurs pour la thérapie génique. Pour ceux-ci, une réglementation spécifique a été créée. La thérapie génique n'a pas été inscrite dans la réglementation au même niveau que l'aspirine ou les antibiotiques.

Aujourd'hui, nous n'avons pas de cadre réglementaire pour les bactériophages. Faut-il ou non le créer ? Il faut que les experts se réunissent et proposent. L'industrie suivra à partir du moment où son cadre d'action sera établi.

Lors d'une réunion à l'EMA à Londres au

mois de juin 2015, les industriels ont confirmé que c'est cela qu'ils souhaitent. Il y a une demande des patients à laquelle ils souhaitent répondre en initiant des essais cliniques. Le problème est que la réglementation ne sera fixée qu'en fonction des résultats de ces essais cliniques !

Il faut arriver à trouver une solution. Nous espérons que le premier essai soit suffisamment positif pour que cela crée un « effet boule de neige » et que, derrière, d'autres suivront. Après les premiers résultats positifs, nous pensons avoir un nouvel élan. Pour l'instant, malheureusement, nous sommes encore dans l'expectative.

Jean-Pierre DECOR.- Des essais sont régulièrement pratiqués à Tbilissi en Géorgie où une expérience de plus de 50 ans a été accumulée. Comment pourrait-on l'utiliser ? Il semble ne pas y avoir eu de catastrophe.

Laurent DEBARBIEUX.- C'est l'une des questions. Les patients ont-ils été suivis pour voir s'il y a eu des problèmes ? Nous pensons qu'il n'y en a pas eu, mais il n'y a pas eu de suivi non plus. Quand on raconte que l'on a pris la rue principale d'un village, que l'on a traité tous les enfants à gauche avec des phages et qu'on n'a pas traité les autres à droite et qu'après un mois de traitement, on a constaté qu'il y avait moins de diarrhées d'un côté de la rue que de l'autre, c'est intéressant mais très insuffisant pour constituer un dossier clinique. Par exemple, y a-t-il eu un suivi un mois plus tard ?

Encore aujourd'hui, quand les patients vont se faire traiter en Géorgie, on leur donne des phages et ils repartent. On suppose que tout s'est bien passé, mais nous n'avons pas le suivi, carte vitale ou dossier médical. Nous ne sommes pas dans le même environnement et on ne peut pas récupérer d'information.

M. PHILIPPON.- D'autres pays sont moins frileux que l'Europe. L'industrie a quand même fabriqué des phages, en particulier aux États-Unis, en Australie et dans d'autres pays. La Food and Drug Administration a accepté 2 suspensions de phages anti-

listéria, anti-salmonelle pour l'industrie agroalimentaire en relation avec le risque des toxi-infections alimentaires.

Notre cadre réglementaire actuel est tel que beaucoup de nos collègues infectiologues envoient leurs malades en Géorgie à l'Institut Eliava. D'ailleurs, le prix des consultations a été multiplié par 10 en 10 ans.

En Europe, on a vraiment un problème réglementaire. Apparemment, la réunion de Londres n'a pas fait avancer ce problème. On n'a pas le droit de les prescrire, alors que scientifiquement, nous sommes persuadés que c'est très actif.

Laurent DEBARBIEUX.- Si le produit n'existe pas, il n'y a pas de prescription possible. Des médecins seraient prêts à le faire, mais faute de produit, ils ne peuvent pas risquer d'utiliser un produit d'origine géorgienne ou russe sans avoir une pleine connaissance de ce qu'il contient.

En ce qui concerne les développements industriels il faut différencier les entreprises. Les réglementations pour l'industrie agroalimentaire sont moins sévères que celles pour les traitements chez l'homme. De plus les 2 entreprises fabriquant les produits anti-listéria ou anti-salmonelles, ne sont pas des sociétés majeures. Ce sont des start-up avec 10 ou 20 employés. Ce n'est pas Du Pont qui fait les phages aux États-Unis.

L'agroalimentaire peut être un marché assez porteur. Une entreprise hollandaise vend le même type de produit pour traiter des fromages, des saucissons en Australie, au Brésil pour la viande. Jusqu'à présent, cela n'a pas été autorisé en Europe. Les entreprises ont plusieurs fois sollicité des autorisations qui ont été refusées. Par contre en Suisse, des produits alimentaires sont traités avec des phages pour empêcher la listériose. Nous sommes entourés de phages !

Jean-Pierre DECOR.- Il est intéressant de noter que les CRISPR ont été découverts par la société Danisco en observant le comportement des bactéries lactiques en

présence de virus.

Alain MÉRIEUX.- Dans les années 70, nous avons repris un petit laboratoire français, Bacté-Intesti-Phage ; les normes de fabrication étaient plutôt empiriques et aléatoires. Nous avons toutefois pu soigner un patient célèbre, M. Marcel Dassault, qui ne vivait et survivait depuis son séjour dans les camps de concentration que grâce aux produits de Bacté-Intesti-Phage.

Par la suite, nous avons été tenus de le fermer par le ministère de la Santé parce qu'il ne correspondait plus aux normes requises pour les établissements pharmaceutiques, avec beaucoup de regrets parce qu'il marchait bien.

Laurent DEBARBIEUX.- C'est le grand problème d'aujourd'hui. Si ce laboratoire n'avait pas fermé, les produits existeraient encore. Dans les années 70, les produits à base de bactériophages étaient inscrits dans le « Vidal »

M. PHILIPPON.- Je me réfère à la revue « Scientist » du mois de janvier qui comporte une revue sur les bactériophages. Trois études cliniques de phase I sont proposées, par une firme française qui s'appelle Pherecydes à Romainville.

Laurent DEBARBIEUX.- Pherecydes est une entreprise qui a le seul essai clinique européen en cours sur les grands brûlés. Les autres essais mentionnés sont en recherche de financement et n'ont pas encore débuté. En effet, nous sommes sur une voie ascendante. Nous sommes dans un contexte différent par rapport à une dizaine d'années. Nous espérons que ce changement va durer.

Jean-Pierre DECOR.- Nous avons évoqué les relations virus/bactéries en termes de compétition. Il serait intéressant que vous développiez l'exemple du choléra où au contraire apparaît une collaboration entre la bactérie et le virus pour la rendre pathogène.

Laurent DEBARBIEUX.- Dans le domaine des bactériophages, tout n'est pas blanc et noir.



Il y a les « gentils virus », ceux qui ne vont qu'infecter les bactéries et les détruire, développant vis-à-vis des bactéries une activité lytique extraordinaire qui permet de régénérer les populations sur la planète à une très grande vitesse et c'est bien.

Mais vous avez également les bactériophages « tempérés » qui ont la possibilité d'intégrer leur génome dans celui de la bactérie. Malheureusement, dans cette intégration, ils apportent avec eux des gènes qui ont des fonctions délétères pour l'hôte et en l'occurrence l'être humain, et c'est le cas du choléra. La toxine cholérique est portée par un bactériophage tempéré. Le *Vibrio Cholerae* n'est pas initialement une bactérie pathogène, mais lorsque ce phage tempéré s'intègre dans ce *Vibrio Cholerae*, sans le détruire, la souche devient plus virulente, exprimant la toxine et entraînant l'épidémie.

Nous avons les deux aspects ; les bactériophages classiques en thérapeutique et exclusivement lytiques et ceux qui vont participer au brassage de gènes car les bactériophages tempérés ont aussi la possibilité, lorsqu'ils s'excisent et repartent de la bactérie pour aller coloniser une autre bactérie, de produire des erreurs. C'est en produisant ces erreurs qu'ils peuvent embarquer avec eux des gènes de la bactérie et permettre la dissémination de ces gènes à d'autres bactéries. Nous avons clairement identifié à travers les bactériophages tempérés des systèmes de transferts horizontaux de gènes très bien expliqués dans d'autres organismes. Il y a d'incessants échanges génétiques médiés par les bactériophages tempérés.

Par les techniques de séquençage on peut différencier les bactériophages tempérés et les bactériophages virulents. Pour avoir une activité tempérée, le bactériophage a besoin d'enzymes dont on connaît bien les séquences. Elles n'ont jusqu'à présent jamais été retrouvées dans les séquences des génomes des bactériophages virulents. On arrive ainsi à distinguer ces deux types

de phages et à s'assurer que dans une application thérapeutique, on ne va utiliser que des virulents et ne pas s'exposer à des transferts de gènes entre bactéries avec des bactériophages tempérés.

Jean-Pierre DECOR.- Nous allons poursuivre la table ronde avec les transferts horizontaux, en particulier ceux qui intéressent l'homme.

Ce matin un certain nombre d'entre nous ont été surpris de découvrir que 8 % de notre génome était d'origine virale.

On a toujours l'impression que cela s'est produit il y a fort longtemps, lorsque les mammifères sont apparus. Mais qu'en est-il aujourd'hui? Avec tous les virus qui nous entourent, est-on en train de se transformer doucement ?

Clément GILBERT.- Le seul virus connu capable de s'intégrer dans le génome de notre lignée cellulaire germinale est le virus de l'herpès. Plusieurs familles sont suivies dans le monde en relation avec ce phénomène. L'herpès est capable de s'intégrer dans les télomères de plusieurs chromosomes. Cela peut se produire dans la lignée germinale et être transmis aux enfants de ces porteurs. Cela a un impact assez négatif puisque quand ces intégrations sont présentes dans toutes nos cellules somatiques et germinales, on a plus de chance de développer certaines maladies de type angine de poitrine. L'association entre les deux phénomènes a été montrée l'année dernière.

À ma connaissance, il n'y a pas d'autre exemple de virus connu pour s'intégrer dans le génome de notre lignée germinale.

Jean-Pierre DECOR.- Est-ce héréditaire ?

Clément GILBERT.- Oui, c'est héréditaire selon les lois de l'hérédité verticale de Mendel.

Jean-Pierre DECOR.- Il faut donc se protéger des virus de l'herpès.

Clément GILBERT.- Eventuellement, mais je ne suis pas sûr que l'on puisse le faire car

plus de 70% de la population humaine est infectée par ce virus.

La probabilité que ce virus s'intègre dans nos gamètes est assez faible mais selon certaines études, 0,5 % de la population humaine en serait porteuse. C'est mesurable.

Quant aux autres copies de virus endogènes (des millions de copies), on s'en accommode très bien. Elles sont le résultat d'événements d'endogénéisation, intégrations, qui se sont produites il y a des millions d'années.

Aujourd'hui, on ne connaît pas la fonction de la plupart d'entre elles. On sait que certaines ont été recyclées. Cela a été le terreau sur lequel la sélection a pu jouer un rôle dans certaines circonstances environnementales pour donner naissance à de la nouveauté génétique.

La question que je me pose est comment, dans un premier temps, des séquences qui ne servent à rien et qui sont peut-être potentiellement délétères, peuvent arriver à rester dans nos génomes et à se fixer dans la population ? Il y a bien sûr l'effet de la dérive génétique. Nous avons des tailles de populations assez faibles, la dérive génétique peut donc jouer un rôle important. Mais je me demande si au départ, ces insertions de rétrovirus endogènes n'auraient pas eu un rôle bénéfique pour les individus porteurs, en les protégeant des infections des virus exogènes qui ressemblent fortement à ces virus endogènes.

Les virus endogènes ne nous auraient-ils pas protégés à un moment donné de l'évolution des virus exogènes dont ils descendent selon le principe de combattre le feu par le feu ? C'est quelque chose qui est déjà connu, qui a été décrit chez plusieurs espèces comme le chat, le poulet ou le mouton. Le mouton est infecté par un beta-rétrovirus qui crée plusieurs troubles physiologiques. Certains moutons ont des copies endogènes ; ce rétrovirus s'étant intégré dans leur génome.

Il s'avère que les moutons porteurs de ces copies de rétrovirus endogènes résistent

aux infections du rétrovirus exogène. On connaît même les mécanismes qui sont en jeu dans cette résistance, ce sont des copies défectueuses de capsides qui sont exprimées dans le génome du mouton. Ces capsides défectueuses rentrent dans l'assemblage du virus exogène et forment ainsi des particules virales défectueuses incapables de sortir de la cellule infectée.

Il y a un autre mécanisme, un gène d'enveloppe cette fois, qui est exprimé dans les cellules de mouton, il est éjecté de la cellule et va interférer avec les récepteurs qu'utilise le virus exogène. Ces interférences empêchent le virus exogène de reconnaître ces récepteurs et de pénétrer dans les cellules.

Ces travaux ont été menés en partie en France par Frederick ARNAUD qui travaille à Lyon sur les interférences entre virus exogènes et virus endogènes.

À l'heure actuelle, il n'y a pas d'exemple dans le génome humain de virus endogène qui nous protégerait contre les virus exogènes. En revanche, on peut se poser la question, dans le contexte de la thérapie génique véhiculée par les virus, si l'on ne pourrait pas utiliser cette technologie afin de se protéger des maladies infectieuses et virales, en plus des maladies génétiques.

C'est peut-être un peu farfelu...

Philippe MOULLIER.- Ce n'est pas farfelu mais il y a déjà tellement à faire...

Jérôme GERVAIS.- Il y a une vingtaine d'années, l'industrie a mis au point un vaccin contre la rage en modifiant génétiquement le virus de canarypox. Ce vaccin a été utilisé pour éradiquer la rage vulpine en Europe. Cela a abouti à un grand succès, puisqu'il n'y a plus aujourd'hui de rage en Europe. Les techniques utilisées à cette époque peuvent-elles encore aujourd'hui être utilisées en thérapie génique ?

Philippe MOULLIER.- Je vais être très direct : je ne peux pas répondre à votre question.



Nous faisons depuis longtemps des virus recombinants. Les propriétés d'un virus pour en faire un vecteur de thérapie génique doivent absolument être non répliquatives, à moins d'être volontairement répliquatives dans certains tissus cancéreux. Cette approche a déjà été développée. Il faut également que ce soit un produit injectable à des patients et répondant à des critères très précis imposés par l'Agence européenne ou française.

Si le vecteur dont vous parlez est non pathogène, non répliquatif et permet de cibler le transfert d'un gène, cela peut être un candidat. À ma connaissance, cela n'a pas été le cas.

J'ai essayé de résumer tout à l'heure très simplement les trois grands virus utilisés aujourd'hui. J'ai laissé une marge de 10 % pour des choses un peu exotiques. Votre question pourrait peut-être entrer dans cet exotisme.

Jérôme GERVAIS.- En l'occurrence, le vaccin était administré par voie orale.

Alain COLENO.- Vous avez dit que le virus de l'herpès pouvait avoir jusqu'à 13 % de matériels génétiques provenant d'un hôte précédent. Quand ce matériel s'insère, avons-nous une idée de la fréquence relative d'insertion de ces gènes par rapport à d'autres ?

Clément GILBERT.- Les 13 % de gènes du génome des virus de l'herpès qui proviendraient d'un génome d'hôte, en l'occurrence des gènes d'eucaryotes, sont fixés dans les espèces de ces virus et sont présents dans toutes les copies des génomes qui constituent l'espèce du virus en question.

Jean-Michel CLAVERIE a parlé des gènes qui proviennent d'eucaryotes dans le génome de virus géants, c'est identique. Il s'agit d'un processus continu ; un flux de gènes de l'hôte au virus.

Dans notre étude sur les baculovirus, quand nous regardons à l'échelle de la population de virus, nous nous rendons compte qu'il y a

aussi énormément d'autres gènes non fixés. Nous avons mesuré une fréquence de 5 % de génomes de baculovirus qui portent une copie d'éléments transposable de papillon. Je pense que cette fréquence est largement sous-estimée, car nous n'avons à notre disposition qu'une partie du génome de papillon pour détecter les séquences de papillon intégrées dans le virus. Si nous avions eu tout le génome de papillon, je pense que nous aurions pu détecter beaucoup plus de gènes intégrés.

Pour répondre à votre question, je pense que c'est un processus continu. La plupart de ces intégrations sont néfastes au virus. Elles l'empêchent de se répliquer correctement. Elles vont être éliminées des populations très rapidement par un effet de sélection purifiante.

À un événement d'infection donné correspond un certain nombre d'intégrations. Au cours de l'infection suivante, la plupart des virus qui possèdent un gène intégré sont incapables de se répliquer. Les autres peuvent se répliquer normalement. Vous avez ainsi tout un autre flux de gènes qui rentre dans la population de virus. À un moment donné, un de ces gènes apportera un bénéfice au virus et va monter en fréquence dans les populations pour se fixer. C'est ce qui s'est produit pour le génome d'herpès virus ou des virus géants.

Jean-Pierre DECOR.- Nous allons passer aux questions relatives aux thérapies géniques. Pour l'oncothérapie, vous avez évoqué les traitements des cancers du cou et de la tête. D'autres propriétés sont nécessaires aux virus-vecteurs ; à savoir faire la différence entre une cellule saine et une cancéreuse. Cette sélectivité doit être la plus précise possible.

Philippe MOULLIER.- Parler de sélectivité serait un peu prétentieux. Nous ne contrôlons pas grand-chose.

Ces traitements reposent sur l'usage de l'adénovirus, qui est toxique par lui-même. C'est déjà un avantage dans une tumeur.

Il y a eu des tentatives, il y a très longtemps, en thérapie génique de traiter des maladies génétiques avec ce virus et cela a entraîné une catastrophe. Un adolescent de 18 ans en est décédé. En conséquence, l'adénovirus a été brutalement arrêté dans son développement pour les maladies génétiques.

Nous avons continué à l'utiliser pour les indications dans le cancer. Les Chinois ont réalisé un énorme travail. Ils ont développé l'adénovirus de type 5 pour les indications en cancer tête et cou, mais toujours en combinaison avec le traitement habituel.

C'est l'association de ces traitements utilisant l'adénovirus qui est largement utilisé en Chine. À ma connaissance, elle n'est pratiquée ni en Europe ni aux États-Unis.

L'indication en oncologie que j'ai très brièvement brossée concerne les leucémies réfractaires qui ne sont pas très fréquentes. C'est simple, mais difficilement applicable à très grande échelle. L'usage de vecteurs dérivés de l'adénovirus permettant l'expression de CAR et donc d'avoir un ciblage spécifique de la tumeur s'avère, pour les essais qui ont eu lieu aux États-Unis sur la côte Est et en Europe, plus qu'encourageant.

Aujourd'hui, il y a plusieurs sociétés de biotechnologies, dont une française, très impliquées pour le développement de cette approche dans ces leucémies et sans doute dans d'autres pathologies cancéreuses.

Il y a eu des tentatives pour le glioblastome sans résultat probant pour l'instant, également pour le cancer du poumon et du pancréas. Il faut aussi reconnaître que ce sont des indications extrêmement compliquées.

Quel gène transférer : un gène suicide, toxique, immunostimulant... ? La grande difficulté est l'absence d'un modèle pertinent en cancérologie.

Gérard ORTH.- J'ai un commentaire à la frontière de ce qui a été fait pour les bactéries,

les phages et ce qu'il est possible de faire en oncologie. Les parvovirus ont du mal à se répliquer dans les cellules, mais ils trouvent dans les cellules cancéreuses un substrat favorable pour permettre leur réplication. C'est un résultat de 30 ou 40 ans, mais qui est toujours vivace. Des personnes continuent à utiliser des parvovirus pour sélectivement tuer les cellules cancéreuses. Ces virus se multiplient préférentiellement au dépend des cellules cancéreuses. Cela doit avoir un certain sens si on continue à le promouvoir.

Philippe MOULLIER.- Vous évoquez les parvovirus qui sont capables de réplication de façon autonome. En thérapie pour les maladies génétiques, nous utilisons les parvovirus dits dépendants. Cela donne d'ailleurs un niveau supplémentaire de sécurité.

Gérard ORTH.- Je voulais élargir le spectre de l'utilité des virus en thérapeutique sans vouloir tout mélanger.

Ghenima CHOUBANE.- Étant donné que la thérapie génique rentre dans le cadre des thérapies ciblées, le but est d'apporter le gène à l'endroit adéquat.

J'ai beaucoup travaillé dans le domaine du VIH. Il y a 1 001 protéines dans le VIH : l'intégrase permet au virus de s'intégrer dans la cellule. Il y a aussi les protéines d'enveloppes. Des récepteurs de chimiokine qui guident le virus pour aller infecter le lymphocyte.

Pour constituer des virus recombinants, le premier objectif est d'emmener le virus au bon endroit. Je pense que le rôle des chimiokines est important car elles orientent vers le territoire cible.

Concernant l'intégration du gène d'intérêt, faut-il enlever tout le génome viral ou faut-il quand même garder quelques éléments du génome viral pour permettre une meilleure insertion au niveau de la cible ? N'y a-t-il pas de conséquences négatives, par exemple infectieuses, qui pourraient découler de ces expériences ?



Philippe MOULLIER.- Aujourd'hui, la technologie recombinante enlève l'essentiel du VIH sauvage pour le remplacer par ce que nous voulons faire exprimer chez les patients. Il faut néanmoins garder deux séquences aux extrémités (LT/LTR) qui sont nécessaires. Le génome, une fois qu'il est entré dans la cellule, qu'il soit recombinant ou sauvage, forme un cercle LT/LTR. Ensuite, il y a un apport nucléaire avec le complexe d'intégration.

Il est nécessaire pour faire un vecteur au niveau du VIH d'avoir ces deux séquences aux extrémités, qui ont d'ailleurs une activité promotrice et également RNase, ce qui n'est pas sans conséquence.

Sur celles-ci, nous avons déjà beaucoup de recul aujourd'hui. Grâce aux technologies de séquençage à très haut débit, l'intégration n'est souvent pas clonale. Elle survient dans des gènes qui n'ont pas d'impact sur le cycle cellulaire. Pour l'instant, c'est plutôt rassurant.

Georges FREYSSINET.- Comment voyez-vous le développement de la technique CRISPR en thérapie génique ? Cela va-t-il entraîner un progrès considérable ?

Philippe MOULLIER.- Oui clairement. La question aujourd'hui est : comment on la véhicule ? Mais il y a déjà des solutions.

A Nantes, nous en développons pour les maladies génétiques dont je vous ai parlé. C'est bien sûr plus astucieux de faire de la chirurgie du génome que de brutalement apporter une copie supplémentaire sans savoir exactement où elle va aller se loger.

Avec CRISPR et la virologie : il faudra en faire un produit injectable. Là est tout notre enjeu. De plus, il va falloir répondre à des questions spécifiques des agences du médicament. Si vous l'injectez, quelle est l'immunogénéité de ce que vous allez exprimer ? Il faudra répondre à toutes ces questions mais c'est certainement un axe très important à l'avenir.

Jean-Pierre DECOR.- Je pense qu'il y a matière à un futur prix Nobel. Quand nous

voyons la précision avec laquelle on arrive à opérer, dans le végétal, au point de ne plus discerner s'il s'agit d'un OGM ou d'un polymorphisme naturel.

Philippe MOULLIER.- Au-delà du traitement, il est possible, grâce à ces technologies, de générer des modèles animaux reproduisant exactement les mutations dominantes chez l'homme.

Je pense à la maladie de Stargardt, maladie fréquente de la rétine. Nous n'avons pas de modèle satisfaisant. Maintenant, nous sommes en train de générer des modèles reproduisant précisément la mutation majoritaire rencontrée chez l'homme.

Nous avons aussi généré tout récemment à Nantes un modèle de maladie de Duchenne chez le rat ce qui est beaucoup plus économique. Pour les chiens que je vous ai montrés, le coût est de 15 € par jour. Il faut les suivre pendant deux ans et les budgets sont complètement explosés.

Des rats avec la pathologie nous coûtent beaucoup moins cher. On a généré ce rat par CRISPR. Cette technologie, c'est non seulement un traitement amélioré mais aussi un moyen de générer des outils de recherche nouveaux.

Jean-Michel CLAVERIE.- Je voulais rebondir sur votre question. J'allais poser la même que Jean-Pierre DECOR. C'est un peu provocateur et il ne faut pas le prendre personnellement.

Après 30, 40 ans d'infectiologie où tu cherches à remplacer le gène malade par un transgène apporté par un virus ; la correction directe du défaut génétique en manipulant la cellule souche du patient avec CRISPR-Cas 9 ne va-t-elle pas être la technique qui va supplanter tous ces travaux précédents ?

Philippe MOULLIER.- Ce n'est pas une question provocatrice parce que je ne regrette pas ce que nous avons fait. La clé de notre métier est de rester ouvert. Il faut apporter le médicament au patient, que ce soit par CRISPR ou par ce que nous avons

fait, cela n'a pas d'importance, du moment que l'on soigne.

La petite Mouna a vu les cheveux de sa mère et évitait les coups de pieds de son frère, a maintenant 21 ans. Même si cette technologie n'est pas idéale, en la voyant ainsi, nous nous disons que nous avons servi à quelque chose...

Si CRISPR peut permettre, dans le futur, de progresser, c'est tant mieux.

C'est ainsi que je réponds à ta question qui n'était pas du tout agressive.

Clément GILBERT.- Suite aux questions relatives à comment véhiculer ces molécules et comment les intégrer dans la cellule, toutes les équipes qui travaillent sur la thérapie génique se focalisent-elles uniquement sur des vecteurs tirés de la nature, donc des virus, ou commencent-elles à construire des vecteurs artificiels ?

Philippe MOULLIER.- Les vecteurs artificiels existent mais le vrai défi est qu'il faut que

cela marche, que ce ne soit pas toxique et en faire un médicament. Il faut aussi passer la barrière de l'EMA et de l'AFDM.

D'ailleurs, cela est positif et nous fait réfléchir sous un angle différent en nous posant des questions auxquelles nous n'avions pas forcément pensé.

Jean-Pierre DECOR.- Nous voilà arrivé au terme de ce colloque qui je pense a été très instructif sur le monde des virus. Je tiens simplement à remercier vivement nos conférenciers pour avoir mis tout leur savoir à notre portée, l'ensemble de l'auditoire pour son attention et sa participation et le personnel de l'Institut de France pour la qualité de son accueil et son dévouement.

Merci à tous

(Applaudissements).

* *

*

(La séance est levée à 16 heures 20.)





17, rue Bourgelat
69002 Lyon - France