

# Les virus de synthèse et leurs perspectives thérapeutiques – Le point de vue de la nano-médecine

Après des années de recherche en biologie ayant consisté à analyser, compartiment après compartiment, les relations entre la structure et les fonctions des composants cellulaires, nous assistons à une révolution conceptuelle : le vivant devient système ; des technologies sophistiquées, comme la biologie de synthèse, transforment le génome en produits chimiques.

Dans ce contexte, des virus hautement pathogènes sont maîtrisés à des fins thérapeutiques et les nanotechnologies nous offrent des outils de vectorisation pour cibler et optimiser leurs effets.

Par **Thierry FUSAI\***

**A**près des années de recherche en biologie consistant à analyser, compartiment après compartiment, les relations entre la structure et les fonctions des différents composants cellulaires, nous assistons depuis une dizaine d'années à une véritable révolution conceptuelle : le vivant est appréhendé dans sa totalité et le chercheur s'essaie à des rapprochements entre l'information biologique obtenue et des pathologies connues. Cette approche a bénéficié, d'une part, dans un premier temps, de la

démarche des technologies convergentes (dites « NBIC », pour Nano-Bio-Info-Cogno) et, aujourd'hui, de la biologie de synthèse et, d'autre part, d'outils d'analyse de plus en plus performants, mais complexes.

Les sciences dites « -omiques » ont bouleversé la conception de la biologie en développant une biologie des systèmes.

S'appuyant largement sur les technologies de pointe et les avancées des technologies de l'information, ces sciences « -omiques » regroupent des champs d'étude de la biologie qui s'intéressent aux interactions dans et entre des ensembles vivants complexes (espèces, populations, individus, cellules, protéines,

\* Médecin en chef, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, chef de la division Appui Scientifique.

ARN, ADN) en prenant en compte l'environnement auquel ces ensembles vivants sont exposés et l'écosystème dans lequel ils vivent. Les « -omiques » les plus connues sont la génomique, la protéomique, la transcriptomique et la métabolomique (voir la figure 1).

Les sciences « -omiques » permettent le développement et l'application de nouvelles technologies pour la prévention de maladies (biocapteurs, outils diagnostiques, nouveaux traitements...). Il s'agit de comprendre comment les gènes, les protéines, etc., interagissent pour former des circuits biochimiques, et d'en avoir une vision causale et dynamique. Ces circuits biochimiques sont soit régulateurs (influences multiples entre des gènes et leurs produits), soit métaboliques (séries de transformations de molécules par des enzymes), auquel cas ils font l'objet de la métabolomique [1, 2, 3].

## LA MÉTABOLOMIQUE

À l'instar de l'étude du transcriptome et du protéome, la métabolomique (l'étude du métabolome) s'inscrit dans un contexte post-génomique.

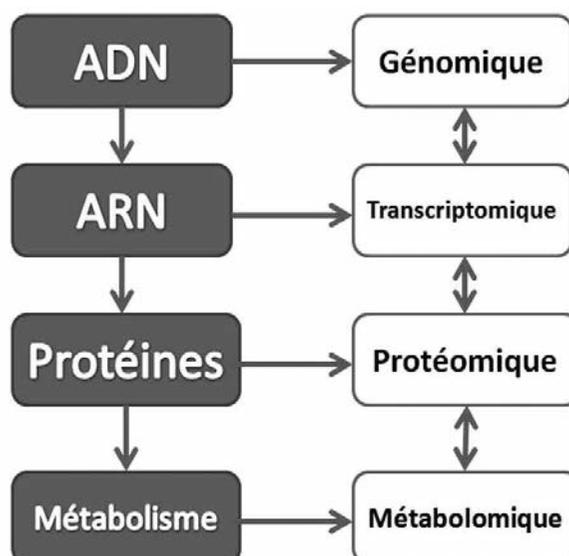


Figure 1 : La taxonomie des sciences « -omiques ».

Le métabolome représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, à une pathologie, à une exposition à un toxique ou à tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement. Comme le protéome, le métabolome est dépendant du contex-

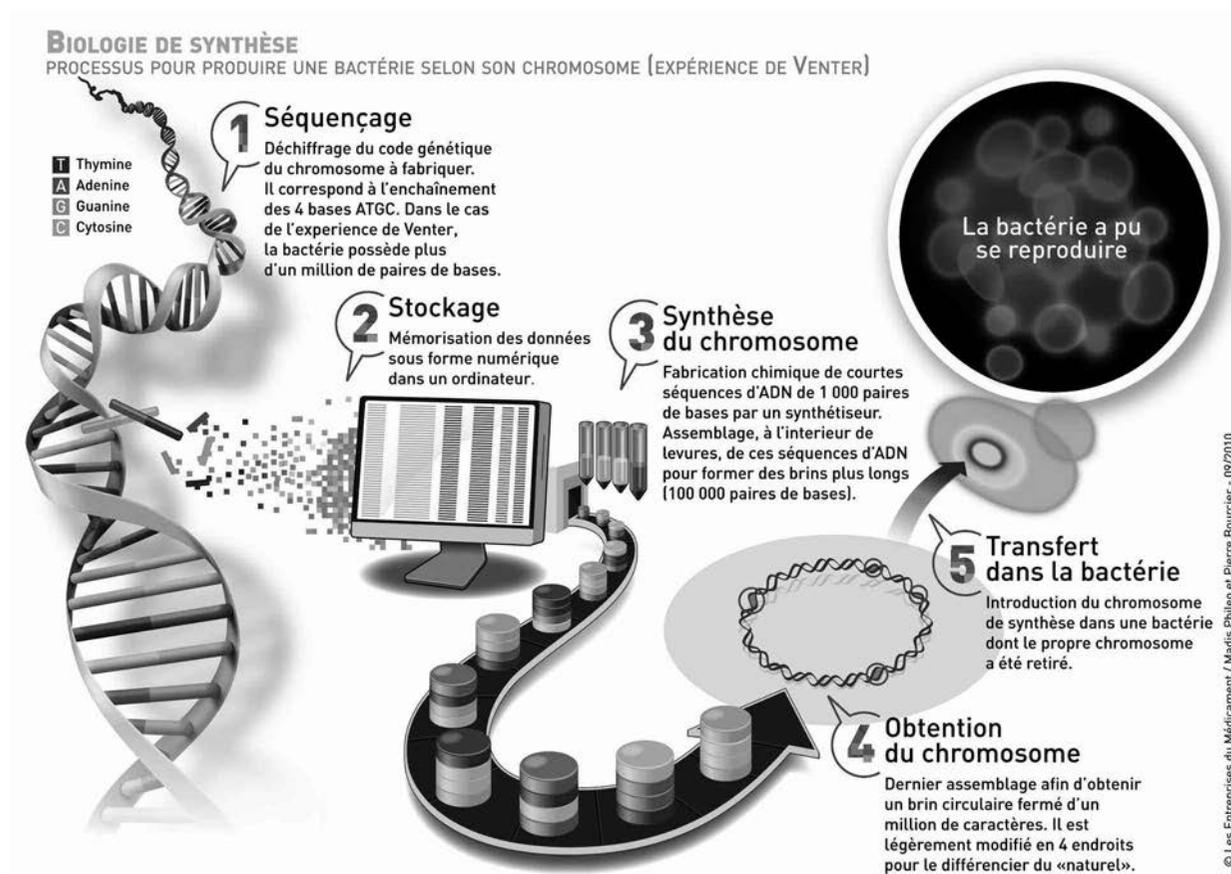


Figure 2 : La biologie de synthèse (Dossier de presse, biologie de Synthèse, publication GENOPOLE, décembre 2010).

te, c'est-à-dire que les taux de protéines ou de métabolites sont modifiés en fonction de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme.

La métabolomique repose sur l'obtention d'empreintes métaboliques obtenues à l'aide de différentes méthodologies analytiques, dont la spectrométrie de masse qui est l'une des principales techniques à ce jour.

L'analyse différentielle des empreintes issues de différents groupes d'échantillons vise à caractériser les répercussions de la modification d'un facteur externe et à visualiser la manière dont un système biologique réagit à cette modification. Elle permet, ainsi, une meilleure compréhension de la biologie des systèmes en mettant en évidence des interrelations métaboliques qui n'auraient pas pu être détectées par les approches biochimiques traditionnelles. Les approches métabolomiques trouvent des applications en médecine (recherche de biomarqueurs en toxicologie, en pharmacologie ou en nutrition, étude du métabolisme des xénobiotiques) ainsi que dans l'agroalimentaire ou en matière d'environnement (phénotypage, caractérisation d'organismes modifiés, suivi de procédés de fabrication).

Sur le plan fondamental, la compréhension du fonctionnement de la cellule ou de l'organisme requiert plus qu'une simple liste de leurs composants, telle que la fournissent certaines technologies « -omiques ». Cette compréhension, qui progresse grâce à des approches dites de biologie systémique, fournit les outils conceptuels requis. Par la suite, dans le cadre de la biologie de synthèse, on parlera d'ingénierie régulateur (ou métabolique), à la fois pour le *design* et la construction rationnelle de circuits biochimiques.

## LA BIOLOGIE SYNTHÉTIQUE

La biologie synthétique consiste, en utilisant des composants ou systèmes biologiques, à modifier des cellules vivantes pour leur conférer des fonctions non « naturelles ». Deux démarches sensiblement différentes relèvent de la biologie synthétique :

- la construction de systèmes métaboliques minimaux, de dispositifs ou de systèmes artificiels biochimiques ou biomécaniques ayant un comportement spécifié au moyen de l'assemblage de « briques » standardisées et réutilisables,
- la synthèse de génomes minimaux, afin de mieux appréhender le fonctionnement des cellules et afin de créer des cellules hôtes (châssis) capables d'une bio-production efficace ou de fonctions simples prédéterminées (par exemple, la synthèse complète d'un petit génome bactérien et sa transplantation dans une bactérie hôte, telles que les réalisées la société Craig Venter).

## LA VIROLOGIE À L'ÈRE DE LA SYNTHÈSE DE GÈNES

Des progrès sans précédents dans la synthèse et dans l'analyse des séquences de l'ADN sont au cœur de la transformation récente de la biologie moléculaire et de l'émergence de la biologie synthétique. Le séquençage d'un brin d'ADN de la taille d'une méga-base est désormais à la portée des chercheurs. La synthèse, quant à elle, peut atteindre de 8 à 30 milliers de paires de bases, ce qui représente la taille du génome de la plupart des virus à ARN et de celui de l'ADN.

Les virus ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique (soit de l'acide désoxyribonucléique, ADN, soit de l'acide ribonucléique, ARN). Ils se reproduisent à partir d'un seul acide nucléique, alors que les autres organismes vivants se reproduisent à partir de la somme de leurs constituants. Ils sont incapables de croître et de subir des divisions binaires. Ils ne contiennent aucune information génétique concernant les enzymes du métabolisme. Enfin, la multiplication des virus implique l'utilisation des structures des cellules hôtes, et plus spécifiquement de leurs ribosomes [4].

Avec une telle définition des virus il n'est pas surprenant que la synthèse de génomes viraux, en l'absence d'un modèle naturel, ait trouvé toute sa place au sein de la biologie de synthèse. La synthèse chimique des génomes viraux constitue un nouvel outil, puissant, pour étudier la fonction et l'expression des gènes viraux, ainsi que leur potentiel pathogène et leur implication dans le métabolisme de la cellule hôte. Cette méthode est particulièrement utile si le modèle naturel viral n'est pas disponible. Elle permet également la modification génétique des génomes viraux sur une échelle qui serait impossible à atteindre par les méthodes classiques de la biologie moléculaire.

Comment un virus à ARN peut-il s'intégrer dans les mondes de la synthèse de l'ADN et du séquençage de l'ADN ?

La réponse à cette question réside dans la « génétique inverse ». Dans leur article de référence de 1978, Weissmann et ses collègues [5, 6] ont transformé l'ARN génomique (comportant 4 127 nucléotides) du phage Q $\beta$  ARN en ADN double-brin, à l'aide de la transcriptase reverse, un enzyme (des rétrovirus) qui transcrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Après intégration de cet ADNc dans un plasmide et la transfection dans une bactérie, un phage Q $\beta$  authentique a été obtenu.

Mais cette méthode avait un faible rendement. L'explication résidait dans la nature de l'ARN du virus (à polarité brin positif, dans le cas où son génome était de la même polarité que l'ARNm [L'acide ribonucléique messenger (ARNm) est une copie d'un gène, destinée à être lue par les ribosomes pour permettre la synthèse d'une protéine (Source : <http://www.futura-sciences.com/>)] , ou à polarité brin négatif, dans le cas contraire).

L'ADNc peut aujourd'hui être facilement préparé et utilisé par différentes stratégies pour régénérer le virus parental à ARN, et ce avec un haut rendement.

L'utilité de la génétique inverse a été rapidement reconnue et, sans surprise, elle a été mise au point pour presque toutes les familles connues de virus à ARN, comme par exemple le virus de la rage (1994), le virus respiratoire syncytial (1995), le virus de la grippe A (1999), le virus de la rougeole (2002), le virus Ebola (2002) et les bunyavirus (2006).

En 2002, Cello et ses collègues [7] ont publié la synthèse chimique acellulaire du poliovirus de type 1 (SPV1). En introduisant volontairement des modifications dans la séquence de son ADNc, ces auteurs ont constaté que ce virus ne se développait que peu, ou pas du tout. Ainsi lorsqu'un virus infecte une cellule, il détourne pour sa propre synthèse les voies métaboliques de la cellule hôte, alors que le poliovirus complet synthétisé chimiquement est capable de se développer dans les cellules hôtes.

Ces travaux permettent d'envisager de nouveaux types de vaccins à partir de virus de synthèse. Ces principes ont été utilisés en 2009 lors de l'épidémie de grippe A H1N1 pour l'élaboration des vaccins. Mais également pour comparer les séquences virales des virus H1N1 provenant de l'épidémie de 1918 [8] avec celles des virus H1N1 provenant de l'épidémie de 2009, qui ont été obtenus à partir de tissus. Ces travaux ont permis de mieux comprendre le rôle de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA), deux enzymes impliquées dans la virulence des virus de la grippe de 1918 et de celle de 2009, ainsi que les points de mutation impliqués dans le virus de la grippe aviaire H5N1, à partir de la séquence de l'HA et de sa capacité de liaison avec les membranes endothéliales.

D'autres virus à ARN ont été synthétisés chimiquement, comme le virus HIV (agent pathogène du sida) et le *SARS-like* coronavirus.

En 2003, l'Institut de Craig Venter a assemblé le génome du virus bactériophage (virus à ADN) PhiX174 (5 386 paires de bases) en seulement deux

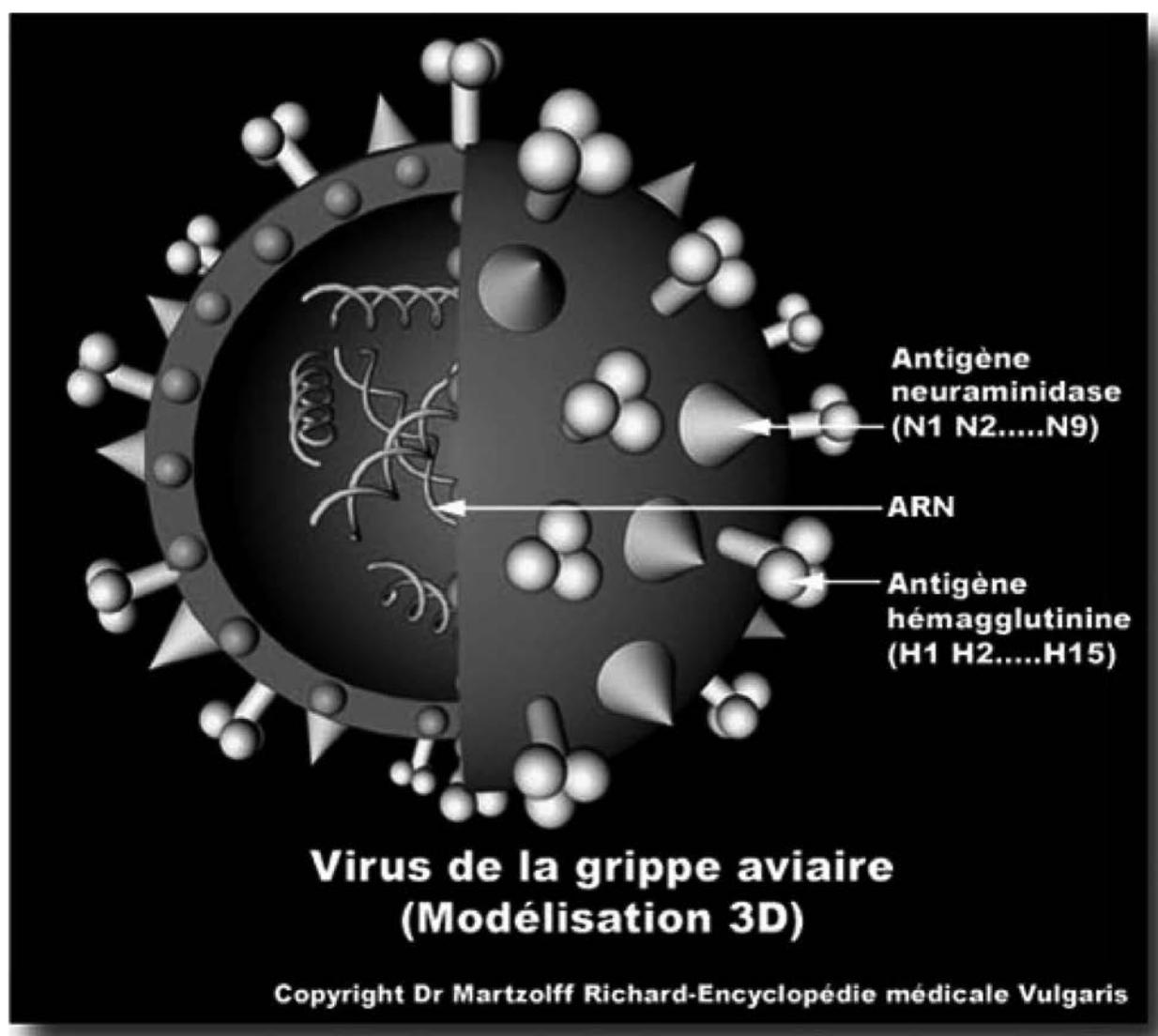


Figure 3 : Le virus de la grippe aviaire.

semaines [9] (c'est le virus de la vaccine (2002 et 2005)). Actuellement, par biologie de synthèse, on peut construire des génomes chimères utilisant telle ou telle séquence du génome d'un virus pour en comprendre l'implication dans la virulence du virus et l'action sur le métabolisme de la cellule hôte, et ce afin de développer des contremesures médicales, thérapeutiques ou prophylactiques.

### LES MOTEURS ACTUELS DE L'ÉVOLUTION DE LA BIOLOGIE DE SYNTHÈSE

La biologie de synthèse trouve ses modes d'action dans différentes avancées technologiques :

- Les convergences « NBIC » (Nano-Bio-Info-Cogno) entre les nano-techno-sciences, les sciences de la vie et les sciences de l'information et de la cognition caractérisent une tendance de fond, depuis 2005,
- L'amélioration des méthodes computationnelles appliquées en biologie. Aujourd'hui, l'état avancé de l'art permet de concevoir et de réaliser des protéines-enzymes et de nouveaux replis protéiques ; des modèles permettent de prédire le résultat de modifications des chemins métaboliques,
- La découverte assistée en biologie. Il ne s'agit plus seulement de robotiser l'expérimentation, mais bien d'assister l'ensemble du cycle cognitif de la découverte (formation d'hypothèses plausibles, déduction de conséquences testables, induction expérimentale),
- Parmi les technologies de miniaturisation/robotisation, la micro-fluidique offre la possibilité de diminuer drastiquement les coûts (étude de petits échantillons), de paralléliser et de mieux contrôler les processus. Cette technologie innovante en pleine expansion devrait permettre, à terme, d'appréhender la complexité biologique au niveau de la cellule et de la molécule,
- L'utilisation de codes génétiques ou de chimies différentes (« xénobiologie ») de l'existant présente l'intérêt de rendre les produits issus de la biologie de synthèse dépendants de composés absents de l'environnement. Elle permet aussi de mieux s'affranchir des interférences entre la cellule et un composant synthétique unique.
- L'hybridation entre nanoélectronique et nano-biologie commence à être envisagée. La biologie de synthèse peut ainsi (par exemple) permettre de réaliser un nano-capteur dans lequel la mesure est effectuée par des macromolécules biologiques hybridées avec des éléments nanoélectroniques servant au calcul et à l'affichage du résultat. Des applications existent déjà, comme ces « laboratoires » des pilules ou sur des puces.

Ces moteurs technologiques doivent être regroupés sur un même site afin de concentrer les plateaux techniques, d'optimiser les résultats et de constituer une masse critique en termes de personnels (sans oublier la formation). Ce type de concentration se retrouve, par exemple, au sein de l'Université de Berkeley, avec le

*Synthetic Biology Engineering Research Center* (SynBERC) » [10].

### UN PONT ENTRE LES NANOTECHNOLOGIES, LA NANO-BIOLOGIE ET LA BIOLOGIE

Les nanoparticules et les nano-objets mis en œuvre par les nanotechnologies sont des assemblages d'atomes ou de molécules ayant au moins une dimension inférieure à 100 nanomètres. À cette échelle, la matière présente souvent des propriétés physiques et chimiques spécifiques du fait de la petite taille des objets et de leur surface importante rapportée à leur volume. Ainsi, un nano-objet est généralement plus réactif au plan chimique que son homologue courant micro-structuré (c'est-à-dire au moins mille fois plus gros). Il peut aussi avoir une résistance mécanique et une conductivité thermique ou électrique beaucoup plus importantes. Sa capacité à s'associer avec d'autres molécules peut être modifiée et mise à profit, par exemple, pour transporter dans l'organisme des médicaments ou capturer des polluants dans l'environnement. Les nanoparticules sont incorporées (en général en petite quantité, dans la masse ou en surface) aux matériaux existants afin d'en améliorer les caractéristiques physiques et/ou chimiques.

### LES IMPLICATIONS DES NANOTECHNOLOGIES DE LA VIROLOGIE DE SYNTHÈSE – LE MÉTABOLOME EN PATHOLOGIE HUMAINE

Si nous considérons un schéma simple, dans lequel des nanoparticules, que l'on pourrait façonner afin qu'elles acquièrent un tropisme spécifique d'anticorps, de ligand, etc., joueraient le rôle d'un vecteur, c'est-à-dire d'un véhicule dans lequel on pourrait mettre tout ou partie d'un virus de synthèse (pour des vaccins, par exemple, ou encore pour transporter des activateurs de gènes déficients en utilisant la capacité des virus à s'intégrer dans les génomes ou de se reproduire dans le cytoplasme des cellules), serions-nous dans la science-fiction ?

Il n'y a pas d'exemple complet de ce schéma, mais des travaux de recherche existent qui démontrent que cela sera possible un jour.

La dengue, une arbovirose [c'est-à-dire une maladie causée par un arbovirus dont la transmission nécessite un arthropode vecteur, ndlr] est un problème mondial de santé publique : il n'existe ni médicament ni vaccin permettant de la traiter. Un candidat vaccin pourrait être obtenu à partir du domaine III de la protéine structurale majeure du virus de la dengue (DENVs) connue sous le nom de *domaine III enveloppe* (EDIII). L'utilisation de nanoparticules bio-composées de polypeptides recombinants EDIII viraux, associées à un

antigène recombinant issu du virus de l'hépatite B, permet d'obtenir une réponse protectrice vis-à-vis de EDIII plus rapidement que par une immunisation traditionnelle (les nanoparticules jouant dans ce cas le double rôle de transporteur et d'adjuvant). Les applications sont doubles : diagnostic de la dengue chez un patient et préparation de vaccins [11].

Certains paramyxovirus (virus à ARN) infectent la cellule après fusion membranaire. Cette fusion est la conséquence de la liaison d'une protéine virale (F) avec un récepteur endothélial (Ephédrine-B2, ou EFB2). Les auteurs de cette recherche ont imaginé de synthétiser un *protocell* constitué d'une membrane nano-poreuse porteuse du récepteur EFB2. En ajoutant ce *protocell* à une culture cellulaire en présence de virus, ils ont constaté que les virus se fixaient sur le *protocell* préférentiellement et y restaient, apportant ainsi la preuve du concept de bio-épuration du *protocell* [12].

La livraison de peptides et de protéines *via* les voies aériennes est l'une des applications les plus intéressantes de la nano-médecine. Ces macromolécules peuvent être utilisées pour de nombreuses applications thérapeutiques, comme la délivrance d'anticorps à visée thérapeutique. Fait intéressant : non seulement les mécanismes facilitant leur dissémination et leur action sur les cellules pourraient impliquer la polarité des peptides et des variations de pH, mais la composition interne de NP pourrait également jouer un rôle dans la détermination de leur efficacité en tant qu'outils d'administration des protéines à différents compartiments cellulaires [13].

L'hépatite C (VHC) est susceptible de perturber les différentes facettes du métabolisme des lipides. Ceux-ci semblent jouer un rôle crucial dans le cycle de vie du virus. Une étude en cours permettra une meilleure compréhension des altérations du métabolisme des lipides provoquées par des infections à tropisme hépatique.

Les particules virales synthétiques (qu'elles soient ou non vectorisées) peuvent dans certaines conditions interagir directement avec les cellules dendritiques qui jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire, et accélérer de ce fait ladite réponse [14].

On peut combattre des bactéries pathogènes grâce à la fabrication de phages (des virus). Il s'est agi d'éradiquer des bio-films, qui jouent un rôle crucial dans la pathogénèse d'importantes infections cliniques. Certains travaux ont ainsi consisté à modifier des bactériophages en vue de cibler les mécanismes de résistance aux antibiotiques utilisés contre les infections à la bactérie *Escherichia coli*.

## CONCLUSION

La biologie de synthèse représente bien un champ nouveau de la biologie, avec son approche méthodologique

mêlant l'analyse scientifique de la biologie à l'ingénierie des biotechnologies. Le diagnostic et la thérapeutique vont bénéficier des avancées biotechnologiques. Quant à la nano-médecine, elle n'en est qu'à ses débuts.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] Biologie de synthèse : développements, potentialités et défis, stratégie nationale de recherche et d'innovation, [www.enseignementsup-recherche.gouv.fr](http://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr), 2011.

[2] FIORASO (G.), « Les Enjeux de la Biologie de Synthèse », Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques, n°4554 *Assemblée nationale*, n°378 *Sénat*, France, 2012.

[3] Synthetic Biology: scope, applications and implications, the Royal Academy of Engineering, United Kingdom, 2009.

[4] GIRARD (M.) & HIRTH (L.), *Virologie générale et moléculaire*, Decitre Ed. 1998.

[5] WIMMER (E.) & al., *Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease*, Nat. Biotechnol., 27 (12), 2009.

[6] WEISSMANN (C.) & al., *Reversed genetics: a new approach to the elucidation of structure-function relationship*, Ciba. Found Symp, 66:47-61, 1979.

[7] CELLO (J.) & al., "Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template", 297:1016-1018, *Science*, 2002.

[8] TAUBENBERGER (J.K.) & MORENS (D.M.), *1918 Influenza: the mother of all pandemics*. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:15-22, 2006.

[9] SMITH (H.O.) & al., *Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides*, Proc Natl Acad Sci USA, 100:15440-15445, 2003.

[10] <http://www.synberc.org/>  
[http://synberc.org/sites/default/files/vol1\\_2012-02-24.pdf](http://synberc.org/sites/default/files/vol1_2012-02-24.pdf)

[11] ARORA (U.) & al., "Chimeric Hepatitis B core antigen virus-like particles displaying the envelope domain III of dengue virus type 2", *Journal of Nanobiotechnology*, 13:10-30, 2012.

[12] POROTTO (M.) & al., *Synthetic protocells interact with viral nanomachinery and inactivate pathogenic human virus*, PLoS One, Mar 1;6 (3):e16874, 2011.

[13] DOMBU (C. Y.) & BETBEDER (D.), "Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles", *Biomaterials*, 34(2):516-25, 2013 (Jan).

[14] SHARMA (R.), *Synthetic virus-like particles target dendritic cell lipid rafts for rapid endocytosis primarily but not exclusively by macropinocytosis*, PLoS One, 7(8):e43248, 2012.