

VIROLOGIE. — *ARN-fragments, inhibiteurs in vivo de la multiplication des virus du fibrome de Shope et de la vaccine.* Note (*) de MM. Mirko Beljanski, Louis Chaumont, M^{mes} Christiane Bonissol et Monique Beljanski, présentée par M. Pierre Lépine.

Parmi plusieurs ARN-fragments isolés après dégradation ménagée des ARN ribosomiques (*E. coli* M 500 Sho-R), seuls certains de ceux obtenus par l'action de la ribonucléase pancréatique inhibent complètement chez le Lapin la multiplication des virus du fibrome de Shope et de la vaccine, sans compromettre la vie de l'animal.

Nous venons de décrire (¹) le procédé permettant d'obtenir, par découpage d'ARN ribosomiques de diverses sources, des ARN-fragments qui *in vitro* agissent avec une relative spécificité comme amorces dans la réplication d'ADN de diverses origines. Cette réplication pourrait être soit fidèle et complète dans une cellule normalement régulée, soit au contraire partielle, non fidèle ou même inversée dans une cellule envahie et perturbée par un virus.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Stock de virus.* — Le stock de virus du fibrome de Shope, souche Boerlage, a été préparé à partir de testicules de lapins infectés *in vivo*. Après 8 jours environ, le lapin présente une orchite importante ; l'animal est sacrifié. L'extrait du broyat de tissus, dilué au 1/5^e dans la solution saline de Hanks, puis centrifugé 10 mn à 5 000 tr/mn, est conservé en ampoules à — 70 °C.

Le titre a été évalué en inoculant les dilutions de virus par voie intradermique et en observant l'apparition des tumeurs. Ce titre est de 10³ DI 50 par 0,25 ml.

Notre stock de neurovaccine lyophilisé a été titré par inoculation intradermique et notation de l'apparition des papules ; le titre est de 10⁶ DI 50 par 0,25 ml.

2. Les ARN-fragments P₁ et P₂ (mélange *a : a*) ont été utilisés. Leur préparation a été décrite précédemment (¹). Ces produits dilués dans l'eau physiologique ont été gardés congelés à — 20 °C.

3. *Inoculation des lapins.* — Des lapins « Fauve de Bourgogne » de 3,5 kg, ont eu les deux flancs rasés. Après désinfection de la peau, le virus et le produit, dilués dans la solution de Hanks, ont été injectés par voie intradermique en 3 ou 4 points par côté à raison de 0,25 ml par site. Le traitement par les ARN-fragments a toujours été effectué dans le flanc droit, le virus seul toujours inoculé au côté gauche.

Les injections intraveineuses (0,5 ml) ont été faites au niveau de la veine marginale de l'oreille, et intramusculaires, au niveau de la cuisse.

II. RÉSULTATS. — A. *Activité des produits de la série P sur le fibrome de Shope* (tableau). — 1. *Evolution de la tumeur* après inoculation de 10 DI 50 dans 0,25 ml.

Au 3^e ou 4^e jour apparaît aux sites d'inoculation une papule qui s'agrandit pour atteindre sa grosseur maximale (diamètre de 1,5 cm environ) vers le 7^e ou le

TABLEAU

Activité in vivo des produits de la série P sur le développement du fibrome de Shope

Temps de traitement	Nombre d'expériences	Nombre de lapins	Dose de produit injecté	Inhibition de la tumeur	Nécrose précoce de la tumeur	
Prétraitement :						
15 jours avant infection .	1	1	1 mg (ID *) de « P » Δ	++++ **		
4 jours avant infection ..	1	2	5 mg (IM *) de « P »	+++ +++		
		1	25 mg (IM) de « T » Δ	—		
		1	30 mg (IM) de t-ARN ▲	—		
4 h avant infection.....	1	2	0,2 mg (ID) de « P »	++++ +++++		
Traitement au temps 0 d'infection	3	5	0,02 mg (ID) de « P »	++++ ++ +	+ +	
(contact préalable de 2 h à 20 °C du produit et du virus)		4	8	0,1 mg (ID) de « P »	—++++ +++ +	+ +
		1	2	0,2 mg (ID) de « P »	++++ +++++	+ +
Traitement au 7 ^e jour d'infection	5	12	0,02 mg (ID) de « P »	++ ++ — — +	+ +	
			0,1 mg (ID) de « P »	— — — + +	+ + + +	
			1 mg (ID) de « P »	+++ +		

Δ : « P » : ARN-r *E. coli* M 500 Sho-R (RNase pancréatique) : P₁ + P₂ (α : a) (1) ; « T » : ARN-r *E. coli* M 500 Sho-R (RNase T₁, non fractionné). — ▲ : ARN de transfert traité par la RNase pancréatique. — * Injection par voie intradermique (ID) et intramusculaire (IM). — ** Inhibition totale : +++++ ; aucune inhibition : — (un signe par lapin).

9^e jour (*pl.*, *a*). Au 10^e jour on observe un début de nécrose qui sera total au 15^e jour. La tumeur régresse spontanément en 20 jours.

2. *Prétraitement* : Le produit injecté à la dose de 1 mg par voie intradermique persiste deux semaines dans les tissus puisque l'inhibition du virus inoculé 15 jours après au même site est totale.

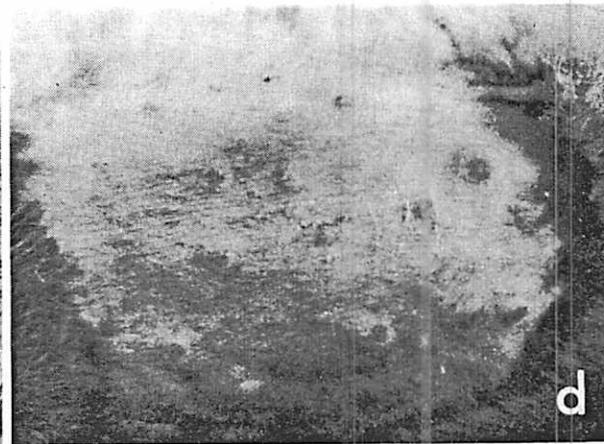
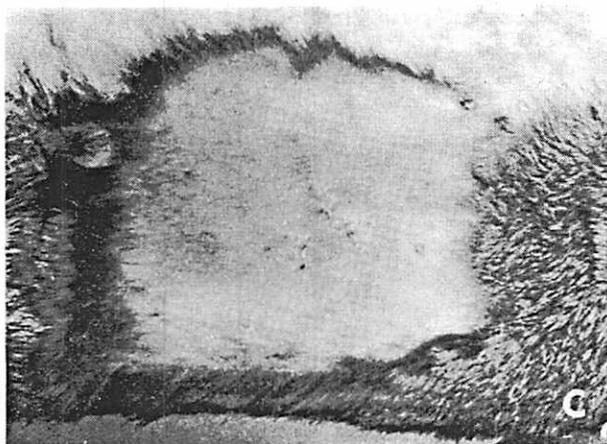
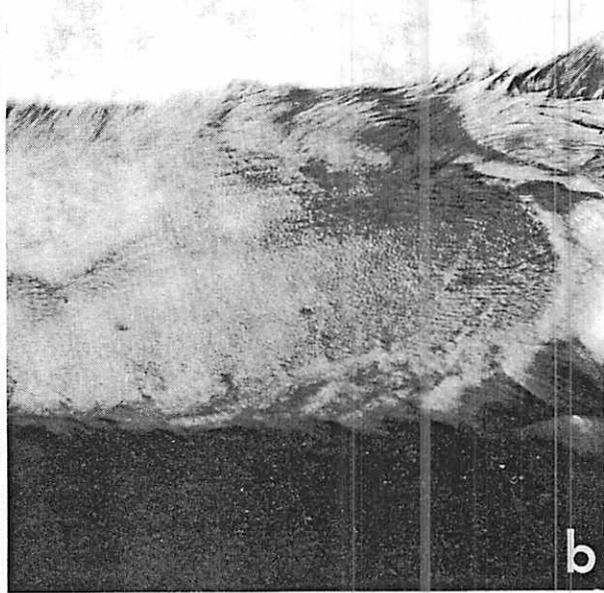
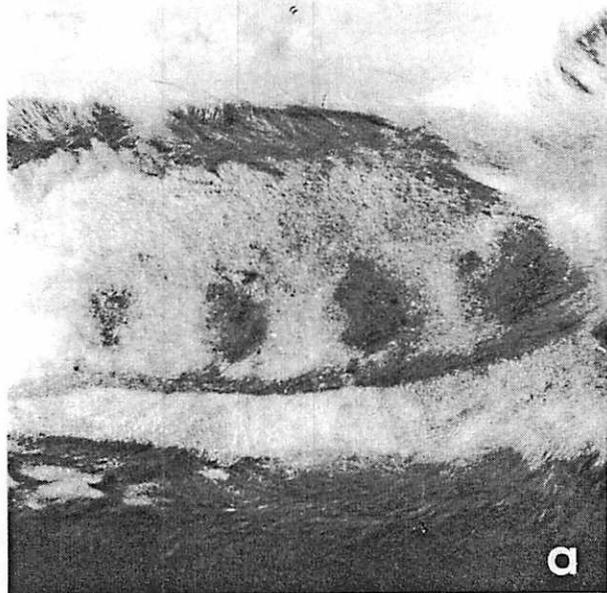
Injecté soit 4 jours, soit 4 h avant le virus, le produit empêche également le développement des tumeurs.

3. *Traitement au temps zéro d'infection* : Le virus (40 DI 50 dans 0,5 ml de Hanks) et le produit (dilué dans 0,5 ml de Hanks) ont été agités séparément et ensemble (mélange *a : a*) pendant 2 h à 20 °C avant d'être inoculés. On peut voir que la dose de produit utilisée (0,2 à 1 mg par site) ne semble pas modifier les

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Virus du fibrome de Shope inoculé par voie intradermique au Lapin : *a*. Tumeurs obtenues au 7^e jour d'infection, côté gauche ; *b*. Absence de tumeur 7 jours après inoculation d'un mélange du virus avec le produit P à la concentration finale de 0,1 mg par point d'inoculation, côté droit (même lapin).
Virus de la vaccine inoculé par voie intraveineuse : *c*. Absence de vésicules dans la zone scarifiée ayant reçu localement au temps zéro d'infection une dose de 0,04 mg de produit P (deux lapins) ; *d*. Nombreuses vésicules dans la zone scarifiée de la peau d'un lapin.

1



résultats. L'inhibition a été totale pour 4 lapins (*pl.*, *b*) et presque totale (apparition d'une très petite papule) pour 6 autres lapins ; dans trois cas le développement de la tumeur a été fortement ralenti avec nécrose précoce de cette tumeur. }

4. *Traitement au 7^e jour d'infection* : Les tumeurs sont alors au maximum de leur développement. L'injection de produit a provoqué l'apparition rapide de la nécrose des tumeurs et un arrêt du développement des tumeurs qui n'avaient pas encore atteint leur grosseur maximale.

5. *Inoculation d'ARN-fragments inactifs* : Dans une expérience nous avons injecté par voie intramusculaire à 1 lapin 25 mg de produit de la série T (RNase T₁ sans séparation sur « Séphadex »). A un autre lapin nous avons administré par la même voie 30 mg d'ARN de transfert (RNase pancréatique). Le virus, inoculé 4 jours après, s'est développé normalement. Ces produits n'ont donc montré aucune activité.

B. *Activité des produits de la série P sur le virus de la vaccine*. — 1. *Evolution des lésions provoquées par l'inoculation du virus de la vaccine* : 200 DI 50 de virus ont été inoculés par voie intradermique à la peau du lapin. De petites papules apparaissent 48 h après. Leur taille n'augmente plus après 4 jours.

Nous avons aussi inoculé ce virus par voie intraveineuse à raison de 10 000 DI 50 dans 0,5 ml et dans le même temps scarifié la peau sur une surface de 3 cm² environ. Après le 6^e jour, on peut voir se former des vésicules dans la zone scarifiée.

2. *Prétraitement local* : Le produit a été injecté par voie intradermique 4 h avant l'inoculation au même site du virus. Le nombre de papules a été diminué de 50 %.

3. *Traitement au temps zéro d'infection* : D'une part nous avons incubé le virus et le produit (concentration finale de 0,06 mg) pendant 4 h à la température ordinaire avant d'inoculer ce mélange. A nouveau le nombre de papules a été moitié moindre que celui noté pour les lapins inoculés avec le virus non traité.

D'autre part nous avons inoculé le virus par voie intraveineuse et injecté localement 0,04 mg de produit dans la zone scarifiée de la peau. Après 8 jours on peut observer de nombreuses vésicules sur la peau des lapins non traités (*pl.*, *d*). Par contre, aucune vésicule n'est apparue dans la zone scarifiée qui a reçu le produit (*pl.*, *c*) ; quelques rares vésicules ont été observées dans la région qui entoure la zone scarifiée. Le contact préalable du virus avec le produit avant inoculation au temps zéro n'est donc pas nécessaire pour que l'action du produit se manifeste.

4. *Traitement de l'infection* : Nous avons inoculé le virus par voie intraveineuse. Dans une expérience, 2 lapins inoculés ont reçu 1 mg de produit par voie intramusculaire 24 h après infection. 5 jours plus tard nous n'avons observé aucune vésicule sur un lapin, mais quelques vésicules sur l'autre lapin. Nous avons retraité ce lapin avec 0,5 mg de produit au 5^e jour. Les vésicules ont immédiatement régressé alors que les vésicules de 2 lapins non traités ont augmenté en nombre et en taille jusqu'au 7^e jour.

Une autre expérience de traitement a été pratiquée 16 h après infection : 2 lapins ont reçu en intramusculaire 3 mg de produit et 1 lapin 10 mg *per os*. Au bout du 4^e jour d'infection, la peau de chacun des 3 lapins non traités présentait 3, 5 et 6 vésicules alors qu'une seule vésicule était observée sur la peau de chacun des trois lapins traités. Nous avons alors effectué sur ces derniers le même traitement qu'à la 16^e heure d'infection et en 48 h la vésicule avait complètement disparu alors que quelques vésicules des lapins témoins commençaient seulement à se dessécher.

III. CONCLUSIONS. — 1. Nous avons pu mettre en évidence *in vivo* une action antivirale de certains des produits de la série P [ARN-fragments obtenus par digestion des ARN ribosomiques par la RNase pancréatique ⁽¹⁾]. La spécificité de ces produits était à prévoir puisque Beljanski et coll. ⁽¹⁾ ont montré précédemment que seuls les produits de cette série interviennent dans la réplication *in vitro* de l'ADN du virus du fibrome de Shope. Le fait que la série T : *a.* soit elle aussi nécessaire à la réplication de l'ADN extrait des cellules normales de la peau de lapin ; *b.* n'ait aucune action sur la réplication de l'ADN du virus, conduit à penser que l'action inhibitrice observée se situe au niveau de la réplication virale et non au niveau des synthèses cellulaires.

Il était également à prévoir que les mêmes produits auraient une action inhibitrice sur le virus vaccinal qui est également un virus à ADN, avec site de réplication intracytoplasmique, ce que nous avons effectivement montré.

Nous devons signaler que nous n'avons eu jusqu'à ce jour aucun succès dans les essais d'inhibition virale réalisés avec les cultures cellulaires *in vitro*.

2. L'action antivirale se manifestant même en traitement de l'infection, ce qui est différent du mode d'action de l'interféron, ouvre une voie possible vers la thérapeutique de certaines maladies virales. Signalons qu'aucune toxicité n'a été observée à aucun moment et que la dose active du produit est 100 fois plus petite que la plus grande dose inoculée à l'animal. La présence intracellulaire d'ARN-fragments exogènes ne semble pas devoir dévier le processus normal de la régulation plus que ne le font les inoculations de virus ou bactéries atténués (vaccins) ou les extraits cellulaires utilisés couramment en médecine.

(*) Séance du 16 décembre 1974.

⁽¹⁾ M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI, M. PLAWECKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 280, Série D, 1975, p. 363.

*Biochimie Cellulaire et Département de Virologie,
Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.*

Intervention de M. RAYMOND LATARJET

Devant ces résultats, intéressants et inattendus, on pense évidemment à un effet d'interféron, M. Lépine a insisté sur les raisons qui semblent éliminer cette possibilité. Je ne suis pas convaincu par l'argument que l'effet inhibiteur du RNA se produise

également sur les cellules déjà transformées, puisque Ion Gresser a démontré, sur d'autres systèmes, que l'interféron peut agir sur de telles cellules. En revanche, M. Beljanski nous précise que son RNA est monofilaire. Il ne saurait donc induire d'interféron. Ou alors, il faudrait que la préparation contienne des impuretés inductrices, ce qui paraît peu probable étant donné le mode de purification utilisé.

Par ailleurs, je suis étonné de ce que l'origine du RNA soit sans importance. Les phénomènes d'interférence virale exigent en général un haut degré de spécificité.

Réponse à M. Latarjet

M. Beljanski : Nos conditions de travail nous imposent un choix et nous avons préféré disposer de quantités importantes d'ARN-fragments (constitués de 25 à 50 nucléotides) actifs contre divers virus plutôt que de préciser tout de suite le mécanisme de leur action.

Sans démonstration nous ne pouvons ni affirmer ni infirmer leur action éventuelle dans la synthèse de l'interféron. Cependant certaines raisons permettent de penser qu'il ne s'agit pas d'interféron : 1. Nos ARN-fragments (1-2 S) sont monocaténares alors qu'il est connu que ce sont des polynucléotides bicaténares qui stimulent la synthèse de l'interféron, à l'exception d'ARN monocaténares de poids moléculaires plus élevés (18-20 S). 2. L'interféron agit aussi bien *in vivo* et *in vitro* contre des virus à ADN et à ARN. Nos ARN-fragments actifs chez l'animal contre les virus à ADN sont inactifs contre les virus à ARN et n'agissent pas en culture de cellules *in vitro* dans les divers systèmes utilisés par nous-mêmes. 3. L'interféron n'agit pas par voie orale alors que nos ARN-fragments agissent. 4. Seuls les ARN-fragments qui interviennent *in vitro* dans la réplication de l'ADN viral inhibent chez l'animal la multiplication de ces mêmes virus. D'autres ARN-fragments, inactifs *in vitro* sont aussi inactifs *in vivo*.

Gresser a montré que l'interféron inhibe la multiplication de cellules leucémiques de souris cultivées *in vitro* et que le traitement par l'interféron d'animaux inoculés avec des cellules tumorales (induites par un virus ou un carcinogène), produit une diminution du nombre des tumeurs et augmente la survie moyenne des animaux.

Mais il est généralement envisagé que l'inhibition des tumeurs n'est pas liée à la production de l'interféron lui-même, mais à un mécanisme d'action, encore inconnu, des inducteurs de l'interféron sur les cellules.

D'autre part l'origine de l'ARN est sans importance dans la mesure où les ARN-fragments riches en G et A renferment dans leur structure les groupements nécessaires à leur fixation sur un ADN donné. La spécificité est très grande à ce niveau.

Intervention de M. BERNARD HALPERN

La question que je désire poser à M. Beljanski se réfère à l'action si remarquable des oligonucléotides qu'ils ont isolés sur l'évolution de la vaccine expérimentale chez le Lapin.

Je voudrais leur demander, en particulier, si après la guérison, car je pense qu'il s'agit d'un traitement administré après le début de l'écllosion de la variole, les animaux ont montré un état d'immunité vis-à-vis de cette infection. S'il en était ainsi, ceci tendrait à montrer que l'infection a bien eu lieu et qu'il s'agit d'une véritable guérison, dans le sens clinique. Dans le cas contraire, il faudrait admettre qu'il n'y a pas eu d'infection du tout.

Réponse à M. Halpern

M^{me} Bonissol : Le virus de la neurovaccine que nous avons injecté à des lapins provoque sur la peau scarifiée des vésicules qui disparaissent spontanément en fonction du temps. Il est connu que l'immunité se développe chez ces animaux ce qui semble prouver qu'il s'agit d'une véritable guérison. Les ARN-fragments actifs peuvent empêcher complètement l'apparition des vésicules ou les faire rapidement disparaître. L'étude de l'immunité par évaluation des anticorps neutralisants chez les animaux traités de diverses manières est en cours.

Question posée par M. RENÉ WURMSER

Il demande à M. Beljanski quelle est la dimension des fragments d'ARN par rapport à celle des courts fragments liés aux ADN de Okasaki.

Réponse à M. Wurmser

M. Beljanski : Les ARN-fragments utilisés dans le présent travail sont constitués de 25 à 50 nucléotides. Okasaki a montré à l'aide de traceurs radioactifs que les polyribonucléotides associés à l'ADN d'*E. coli* sont constitués de 50 à 100 nucléotides (1972). Je rappelle qu'en 1971 nous avons isolé des polyribonucléotides associés à l'ADN d'*E. coli* et montré qu'ils sont constitués de 50 à 150 nucléotides.

Intervention de M. J. ANDRÉ THOMAS

Les deux communications de M. Beljanski et de ses collaborateurs, que vient d'exposer M. Pierre Lépine, peuvent marquer un stade important.

1. Si les courtes séquences ARN individualisées par M. Beljanski (de l'ordre de 30 à 50 nucléotides) sont monocaténaïres, il ne s'agit pas d'interféron.

2. Si de telles séquences ont un effet antiviral (quel que soit le mécanisme en cause) et sont aussi courtes, elles pourront probablement être obtenues par synthèse, ce qui sur le plan au moins théorique serait de haut intérêt. En outre, le choix de la voie de leur introduction dans l'organisme est peut-être fondamental, à cause de l'action immédiate de la ribonucléase. C'est ainsi que, dans le cas de nos recherches sur l'ARN infectieux du virus de la fièvre aphteuse, la voie préférentielle s'est révélée être de loin l'introduction directe dans les tissus à cellules permissives.

Parmi ses essais, M. Beljanski a-t-il tenté l'inoculation de ses ARN par voie intra-muqueuse, et même intra-nasale qui, pour certaines prémunitions, pourrait être privilégiée ?

Réponse à M. Thomas

M. Beljanski : Il est très probable que la synthèse chimique d'ARN-fragments correspondant à ceux que nous avons isolés à partir d'ARN ribosomiques bactériens et agissant contre les virus à ADN sera réalisée dans l'avenir.

Nos ARN-fragments, par leur teneur en G et A et leur relative résistance à la ribonucléase, ont pu être inoculés par les voies intradermique, intramusculaire, intraveineuse et orale. Actuellement, dans certaines expériences, nous utilisons également la voie intra-nasale chez la Souris.