

## **C**lonage de l'ADN complémentaire codant pour le récepteur de l'interféron $\alpha$ humain

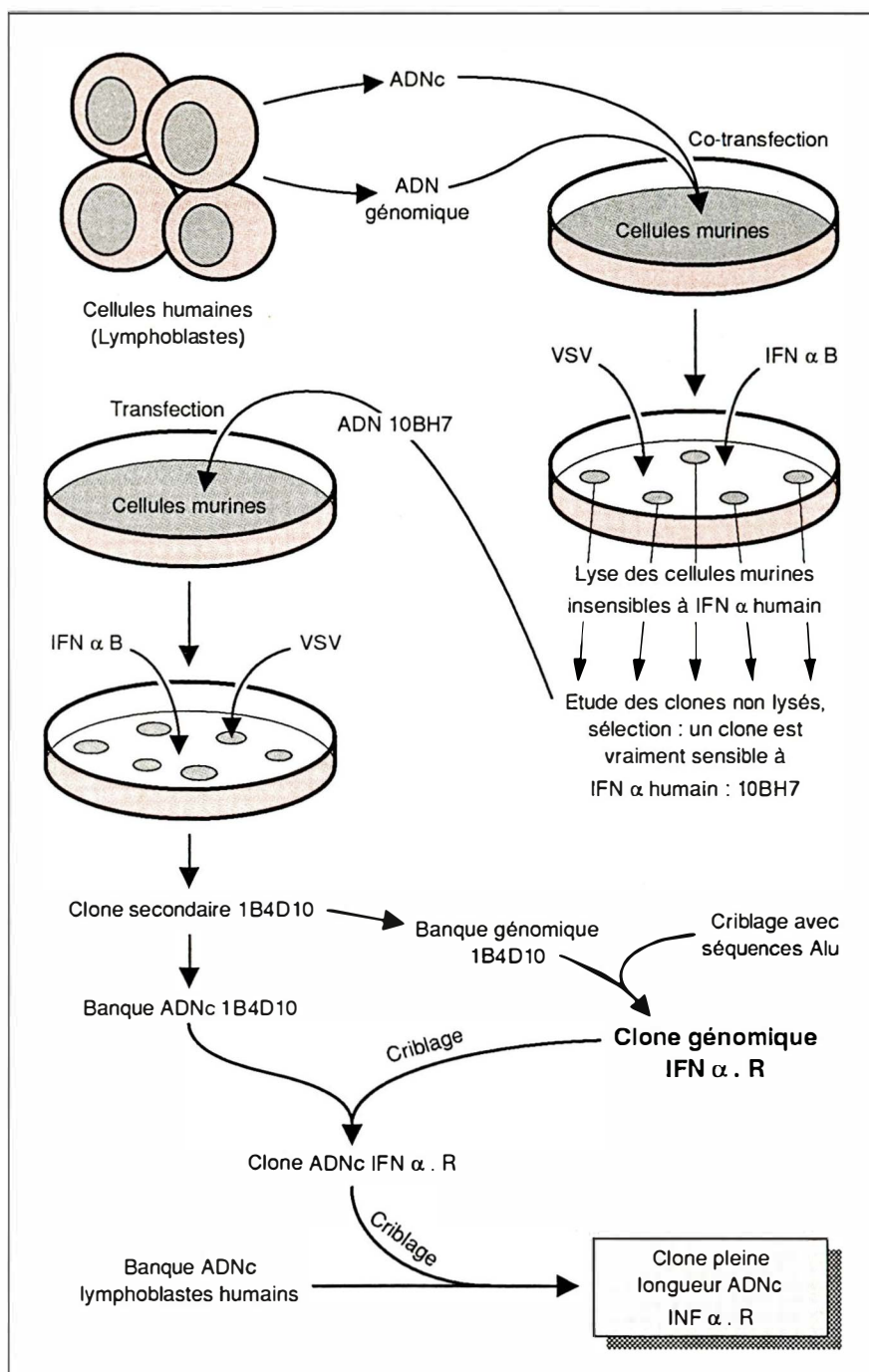
Les interférons sont des molécules caractérisées par leur propriété de conférer une résistance antivirale à des cellules traitées. Le récepteur de l'interféron  $\alpha$  a été récemment isolé par les équipes de M. Aguet et de G. Merlin (*m/s* n° 2, vol. 5, p. 124). Les différentes iso-espèces d'interféron  $\alpha$  (codées par 20 gènes différents) et d'interféron  $\beta$  semblent se fixer sur le même type de récepteur, qui est exprimé à un très faible niveau à la membrane cellulaire et est donc extrêmement difficile à purifier complètement et à analyser d'un point de vue structural. Il existe une importante barrière d'espèces entre les interférons, la plupart des molécules humaines étant, par exemple, sans efficacité sur des cellules murines. Cette spécificité semble en rapport avec la non-fixation des interférons d'une espèce sur les récepteurs d'une autre espèce. C'est en se servant de toutes ces propriétés, et alors qu'il n'existait aucun anticorps disponible, que l'équipe d'I. Gresser (Cnrs, Villejuif, France) vient de parvenir à cloner l'ADNc codant pour le récepteur de l'interféron  $\alpha$  humain [1]. Des cellules murines ont été transfectées avec de l'ADN génomique humain mélangé à de l'ADN d'une banque d'expression d'ADNc humain. Le but de ce mélange était d'augmenter les chances que des molécules fonctionnelles de récepteur soient exprimées dans les cellules de souris, codées, soit par un fragment génomique, soit par un clone d'ADNc. Les cellules ont alors été traitées avec une isoforme d'interféron  $\alpha$  humain (IFN $\alpha$ B) et infectées par un virus cytopathique (le virus de la stomatite vésiculaire VSV). Les cellules murines sont insensibles à

l'interféron humain et sont lysées par le VSV, à moins qu'elles n'expriment un récepteur d'interféron humain fonctionnel. Des clones ayant survécu à l'infection virale ont donc été obtenus et testés par de nouveaux cycles d'infection virale en présence d'interféron humain. Un seul clone se révéla réellement sensible à l'IFN $\alpha$  humain. Son ADN fut utilisé pour réaliser une transfection secondaire de cellules murines, ensuite sélectionnées comme indiqué ci-dessus pour leur résistance antivirale induite par l'IFN $\alpha$  humain. Les clones secondaires en fin de compte obtenus ne contenaient que de l'ADN génomique humain, et pas d'ADNc, prouvant que la synthèse du récepteur était due à l'expression d'un gène humain, et non d'un clone d'ADNc. Une banque génomique de l'ADN de ces clones secondaires fut construite et criblée grâce à des sondes spécifiques de séquences répétitives humaines (séquences Alu). Un fragment de l'un des clones génomiques obtenus fut alors utilisé pour isoler un clone d'ADNc provenant d'une banque de cellules murines transfectées sensibles à l'IFN humain. Cet ADNc fut lui-même employé comme sonde pour cribler une banque d'ADNc de cellules humaines (figure 1). Un clone de grande taille fut séquencé : il a le potentiel de coder pour une molécule de 557 acides aminés comportant un peptide signal, une grande région extracellulaire, un seul segment transmembranaire et une portion carboxy-terminale intracytoplasmique de 100 résidus. Cet ADNc intégré à un vecteur d'expression transféré dans des cellules murines les rend sensibles à l'IFN $\alpha$ B, mais pas ou peu aux autres isoformes d'IFN $\alpha$  et aux IFN $\beta$

et  $\gamma$ . Ce résultat semble en contradiction avec les données antérieures indiquant que le même type de récepteur lie les interférons  $\alpha$  et  $\beta$ . En fait, il se pourrait que le récepteur normal fût constitué de plusieurs protéines, dont l'une serait codée par l'ADNc isolé par I. Gresser *et al.* Dans les cellules de souris exprimant cet ADNc, une structure fonctionnelle serait reconstituée grâce à la participation de composants murins, le complexe hybride résultant n'ayant de l'affinité que pour certains des ligands normaux du complexe purement humain correspondant. Quoi qu'il en soit, l'isolement du récepteur de l'IFN $\alpha$ ... ou de l'un de ses composants constitue un progrès significatif, d'autant plus important que l'IFN $\alpha$  est aujourd'hui d'utilisation croissante dans des maladies humaines, notamment des leucémies (leucémie myéloïde chronique, leucémie à tricholeucocytes). Il faut noter que les seuls ADNc de récepteurs d'interféron caractérisés à l'heure actuelle, ceux pour IFN $\gamma$  et IFN $\alpha$ , ont été isolés par des équipes françaises ou à forte participation française.

A.K.

1. Uzé G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon  $\alpha$  receptor into mouse cells : cloning and expression of its cDNA. *Cell* 1990 ; 60 : 225-34.



■■■ **Activité anti-HIV d'un inhibiteur de la protéase virale.** Tenter d'empêcher le virus HIV-1 d'atteindre sa cible ou d'y pénétrer en interagissant avec son récepteur et chercher à bloquer sa réplication en inhibant l'étape nécessaire de transcription inverse de l'ARN viral constituent les deux principales voies de recherche d'une thérapie anti-HIV. T.J. McQuade *et al.* de la *Upjohn Company Kalamazoo* (MI, USA) et du NIH (Bethesda, MD, USA) ont opté pour une autre stratégie : l'inhibition de la protéase qui permet de cliver les précurseurs protéiques du virus en leur forme mature, protéines de structure et enzymes nécessaires à sa réplication [1]. Les auteurs ont synthétisé un analogue du substrat de la protéase, le peptide U81749, comportant un groupe dipeptidyl non hydrolysable au site de clivage. Ce composé est capable d'inhiber la protéase *in vitro* et la réplication du virus dans les lymphocytes circulants de façon beaucoup plus active que la pepstatine A, cet inhibiteur des aspartyl protéinases dont l'activité anti-HIV reste faible malgré les fortes concentrations utilisées. Le caractère réversible de cette inhibition limite encore l'efficacité d'une telle approche. L'absence de toxicité de ce type de molécule chez l'animal suggère cependant que des dérivés du peptide U81749, non toxiques mais permettant d'inhiber la protéase de façon irréversible, pourraient être produits.

[1. McQuade TJ, *Science* 1990 ; 247 : 454-6.]

Figure 1. **Principales étapes de l'isolement d'un clone pleine longueur d'ADNc du récepteur de l'interféron  $\alpha$  (INF $\alpha$ -R).** La base du criblage a consisté à rendre des cellules murines sensibles à l'interféron  $\alpha$  humain, donc résistantes au virus de la stomatite vésiculaire (VSV) en présence d'IFN $\alpha$ . Cela a été obtenu par transfection avec de l'ADN de lymphoblastes humains. L'ADN d'un premier clone cellulaire résistant 10BH7 a servi à transfecter de nouvelles cellules murines. Un clone secondaire B4D10 a été obtenu sur les mêmes bases. Il a servi à construire une banque génomique et une banque d'ADNc. La première a été criblée avec des séquences Alu humaine. Un fragment génomique, ainsi isolé, a permis d'isoler un clone d'ADNc qui a lui-même été utilisé comme sonde pour cribler une banque d'ADNc de lymphoblastes humains. C'est de cette banque qu'a été isolé un clone contenant toute la séquence codante du récepteur d'IFN $\alpha$  humain.