



HAL
open science

Développement de nouvelles approches antivirales du virus de l'hépatite C basées sur l'utilisation d'interférons alpha variants et d'antisens de type Peptide Nucleic Acids.

Amaury Martin

► To cite this version:

Amaury Martin. Développement de nouvelles approches antivirales du virus de l'hépatite C basées sur l'utilisation d'interférons alpha variants et d'antisens de type Peptide Nucleic Acids.. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT: . tel-00136018

HAL Id: tel-00136018

<https://theses.hal.science/tel-00136018v1>

Submitted on 10 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 Août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 9 mars 2007

par
Amaury MARTIN

Développement de nouvelles approches antivirales du virus de l'hépatite C basées sur l'utilisation d'interférons-alpha variants et d'antisens de type Peptide Nucleic Acids

Directeur de Thèse : Dr. Olivier HANTZ

JURY:	Dr. Tadamasu OOKA	Président
	Dr. Dina KREMSDORF	Rapporteur
	Dr. Jean-Claude GUILLEMOT	Rapporteur
	Dr. Bruno CANARD	Examineur
	Pr. Fabien ZOULIM	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique
Vice-Président du Conseil d'Administration
Vice-Président du Conseil des Études
et de la Vie Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX
M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT
M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut Techniques de Réadaptation
Département de Formation et Centre
de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
Directeur : M. O. ROBIN
Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Électrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR STAPS
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques
de l'Ingénieur de Lyon
IUT A
IUT B
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
Directeur : M. le Professeur H. PINON
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
Directeur : M. le Professeur M. EGEA
Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO
Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

II - REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr Olivier Hantz** pour avoir encadré ce travail de thèse. Un grand merci également au **Pr Fabien Zoulim** pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Sans vos connaissances, vos conseils, vos critiques et votre aide ce travail n'aurait pas été possible. Merci enfin au **Pr Christian Trepo**, directeur de l'unité pendant ces années de Doctorat et de Master.

Merci à mes rapporteurs, **Mme Dina Kremsdorf** et **M. Jean-Claude Guillemot**, qui ont accepté d'évaluer mon travail et m'ont fait part de leurs remarques pour améliorer le manuscrit. Merci également à **M. Tadamasa Ooka** et à **M. Bruno Canard** d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à mes co-bureaux successives (**Séverine, Isabelle** et **Julie** alias *S. Margarita, La poule* et *Fif*) pour m'avoir supporté à vos côtés, pour tous vos conseils et pour votre bonne humeur à l'origine de nombreux fou-rires. Une petite pensée à ceux qui ne sont déjà plus au labo au moment de la rédaction de cette thèse et avec qui ces presque 5 années au laboratoire ont été un plaisir : **Maud, Aurélie, Cynthia, Bénédicte, Anne Carole, Olivier** (ouf ! enfin un homme !!), **Bettina, Marie-Noëlle** et tous ceux que j'oublie.

Merci à Microsoft pour créer des logiciels remplis de bugs et aux utilisateurs qui ont la poisse informatique (une pensée particulière à **Isabelle C.** et **Lucyna**). Sans vous tous, la gestion informatique du labo aurait été d'une tristesse absolue. Finalement l'INSERM U271 est aussi un labo de recherche sur les virus... informatiques !

Merci à **David** et **Sandra** pour représenter dignement l'OM dans la ville 5 fois championne de France (bientôt 6 ?); ce n'est pas donné à tout le monde une telle persévérance ; merci pour votre gentillesse et pour m'avoir fait découvrir les joies des Bodega Arlésiennes !

Merci à **Hervé** et **Marie-Agnès** pour votre travail indispensable à la vie du labo. Merci à **Christine** pour son aide dans certaines manips. Merci à **Vanessa** pour le travail réalisé sur les interférons. Sans ton aide, ma thèse ne serait probablement pas terminée à ce jour.

Merci à **Ludmila** pour ses encouragements, ses traductions, ses cadeaux et surtout pour tous les chocolats de pâques, halloween ou Noël et pour la décoration du laboratoire.

Merci au Ministère Français de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur pour m'avoir financé pour ce travail, à **Bernard Bigot, Alain Cozzone**, à l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites pour avoir financé une partie des recherches, à Virgil pour les supers restos et pour m'avoir donné envie de poursuivre en direction des projets Européens. Merci à l'Association Bernard Gregory et **Annie Gualino**.

Last but not least... un énorme merci à ma famille : **Colette, Patrick, Cyriel** (et **Emmanuelle**) sans oublier **Madeleine** pour leurs conseils toujours avisés et leur affection ; un coup de chapeau à tous les « **amis du quotidiens** » qui tolèrent avec bonne grâce la musique de daube de DJ Momo, et enfin un gigantesque merci à **Stéphanie** pour me supporter au quotidien, une tâche pas loin d'être aussi difficile que la rédaction d'une thèse !

III - TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	2
I - Composantes de l'Université Claude Bernard	3
II - Remerciements	5
III - Table des Matières	7
IV - Table des Illustrations	11
V - Liste des Abréviations	15
INTRODUCTION GENERALE	17
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	21
I - Le virus de l'hépatite C : données épidémiologiques et cliniques	23
A - ÉPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE C	23
1 - Prévalence de l'infection	23
2 - Mode de transmission	24
2.1 - Transmissions parentérales	24
2.2 - Autres modes de transmission	26
B - HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VHC	29
1 - Infection aiguë	30
2 - Infection chronique	31
3 - Cirrhose et carcinome hépatocellulaire	31
II - Le virus de l'hépatite C : données moléculaires, modèles d'études	33
A - PRESENTATION VIROLOGIQUE	33
1 - Classification	33
2 - Particule virale	34
3 - Structure du génome	34
B - STRUCTURES ET FONCTIONS DES PROTEINES VIRALES	35
1 - Protéines structurales	35
1.1 - Capside et protéine F	35
1.2 - Glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2	35
1.3 - P7	36
2 - Protéines non structurales	37
2.1 - NS2	37
2.2 - NS3	37
2.3 - NS4A et NS4B	37
2.4 - NS5A et NS5B	38
C - REGIONS NON CODANTES	39
1 - 5'UTR : IRES	39
1.1 - Généralités sur la traduction et les IRES	39
1.2 - Structure et de la région 5'UTR du VHC et mécanisme de traduction	40
2 - 3'UTR	42
D - CYCLE VIRAL	44
1 - Tropisme	44
2 - Entrée dans la cellule	44
2.1 - Récepteurs	44
2.2 - Entrée Ph Dépendante	44
3 - Modèle du cycle viral	45
E - VARIABILITE GENETIQUE	46
1 - Réplication et variabilité génétique du VHC	46
2 - Émergence et diversification des génotypes du VHC	47
3 - Distribution en quasiespèces des génomes	48
4 - Implications cliniques	48
F - MODELES D'ETUDES	49

1 - Modèles animaux	49
1.1 - Le chimpanzé	49
1.2 - Les petits animaux	49
2 - Virus modèles apparentés au VHC	50
2.1 - GB Virus –B (GBV-B)	50
2.2 - Virus de la diarrhée bovine (BVDV)	51
2.3 - Le modèle du poliovirus	51
3 - Modèles d'études de la réplication virale en culture cellulaire	51
3.2 - Les réplicons VHC	53
3.3 - Système de réplication complet	55
4 - Systèmes d'expression in vitro	57
4.1 - Pseudo-particules rétrovirales	57
4.2 - Plasmides bicistroniques pour l'étude des régions UTR	58
III - Les traitements actuels et futurs du VHC	59
A - INTERFERON ET RIBAVIRINE	60
1 - Les interférons	60
1.1 - Les différents interférons	60
1.2 - Biosynthèse des IFN au cours de l'infection VHC	61
1.3 - Récepteurs, signaux de transduction	65
1.4 - Immunomodulation	70
2 - La ribavirine	71
2.1 - Généralités	71
2.2 - Actions de la ribavirine	71
3 - Données clinique de la bithérapie	73
B - PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	74
1 - Amélioration de la bithérapie actuelle	75
1.1 - Nouveaux Interférons	75
1.2 - Dérivés de la ribavirine	77
2 - Inhibiteurs spécifiques du VHC (hors approche antisens)	78
2.1 - Inhibiteurs de l'entrée et la morphogénèse	78
2.2 - Inhibiteur de la protéase NS3-4A	79
2.3 - Inhibiteur de l'hélicase/NTPase NS3	80
2.4 - Inhibiteurs de polymérase NS5B	80
2.5 - Le problème de ces approches : l'apparition de résistances.	83
3 - Approches immunologiques	83
3.1 - Perspective vaccinale	83
3.2 - Renforcement des réponses innées	85
IV - L'approche antisens	87
A - GENERALITES	87
1 - Principe	87
2 - Mécanismes d'action	87
2.1 - Activation de la RNase-H	88
2.2 - Action par occupation du transcrit	89
2.3 - Action par déstabilisation du transcrit	89
3 - Paramètres contrôlant l'efficacité des antisens	89
3.1 - Stabilité vis-à-vis des nucléases	89
3.2 - Stabilité de l'hybride formé avec l'ARN	89
3.3 - Spécificité de l'antisens pour sa cible	90
3.4 - Accessibilité de la cible	90
3.5 - Pénétration des antisens et distribution intracellulaire	90
3.6 - Toxicité	90
4 - Oligonucléotides utilisés dans la stratégie antisens	90
4.1 - Premières générations d'antisens	91
4.2 - Deuxièmes générations d'antisens	92
4.3 - Générations futures ?	95

B - APPLICATION AU VHC DES APPROCHES ANTISENS	100
1 - <i>Inhibition avec blocage de la traduction</i>	101
1.1 - Phosphorothioates et dérivés	101
1.2 - RNA aptamères	101
2 - <i>Inhibition avec clivage</i>	101
2.1 - Ribozymes	101
2.2 - siRNA	102
C - UN ANTISENS PARTICULIER : LES PEPTIDE NUCLEIC ACIDS (PNA)	103
1 - <i>Généralités</i>	103
1.1 - Structure	103
1.2 - Caractéristiques	103
1.3 - Mode d'action des PNA	104
2 - <i>Utilisation des PNA comme « outil » de biologie moléculaire</i>	105
3 - <i>Applications thérapeutiques des PNA</i>	106
4 - <i>Le problème de la pénétration cellulaire</i>	106
4.1 - Molécules non modifiées	106
4.2 - Modifications des PNA	108
RESULTATS ET DISCUSSION	111
I - Objectif des Travaux	113
II - Étude 1: Interférons-alpha variants	115
A - ARTICLE	117
B - INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	125
C - RESULTATS	127
D - DISCUSSION	129
E - CONCLUSION	130
III - Étude 2: PNA linéaires dirigés contre l'IRES du VHC	131
A - ARTICLE	133
B - INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	149
C - RESULTATS	151
D - DISCUSSION	154
E - CONCLUSION	156
IV - Étude 3: PNA cyclique anti-IRES du VHC	157
A - ARTICLE	159
B - INTRODUCTION ET BUT DE L'ETUDE	169
C - RESULTATS	170
D - DISCUSSION	172
E - CONCLUSION	173
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	181

IV - TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Prévalence de l'infection par le VHC estimée par l'OMS en 2003. (Shepard <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figure 2 : Estimation du taux de prévalence des anticorps anti-VHC en 1988-1994 et 1999-2002 dans la population américaine et en fonction de l'âge. (Armstrong <i>et al.</i> , 2006)	24
Figure 3 : Évolution du risque résiduel estimé de transmission d'infections virales par transfusion en France entre 1992 et 2002. (Pillonel et Laperche, 2003)	25
Figure 4 : Séroprévalence du VIH et du VHC par classe d'âge en France. (Jauffret-Roustide <i>et al.</i> , 2006).....	25
Figure 5 : Taux de prévalence pour les anticorps anti-VHC dans la population Égyptienne entre 10 et 50 ans, selon les régions. (Frank <i>et al.</i> , 2000).....	27
Figure 6 : Proportion de nouvelles infections au VHC attribuables à des injections non sûres. (OMS - 2000).....	27
Figure 7 : Nombre de séroconversions professionnelles VHC chez le personnel de santé selon l'année de l'Accident Expositant au Sang (AES), France, situation au 31/12/2004. (Lot <i>et al.</i> , 2005).....	27
Figure 8 : Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC. (Chen et Morgan, 2006)	29
Figure 9 : Réponses immune au cours d'une infection VHC aiguë. (Bowen et Walker, 2005).....	30
Figure 10 : Comparaison d'un foie normal vs un foie cirrhotique	31
Figure 11 : Place phylogénétique du VHC et des hépacivirus dans la famille des <i>Flaviviridae</i> . Arbre réalisé à partir des polymérase virales. (Ferron <i>et al.</i> , 2005).....	33
Figure 12 : (A) Observation microscopique de particules (Petit <i>et al.</i> , 2005) et (B) Structure schématique de la particule virale C. (James A. Perkins 2001).....	34
Figure 13 : Organisation du génome viral (a) et représentation du clivage de la polyprotéine (b). (Lindenbach et Rice, 2005)	34
Figure 14 : Modélisation de la capsid du VHC. © epidemic.org	35
Figure 15 : Modèle hypothétique résumant le repliement et l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe du VHC. (Chapel <i>et al.</i> , 2006b).....	36
Figure 16 : Modélisation de NS3. (Lindenbach et Rice, 2005).....	37
Figure 17 : Modélisation d'un dimère du domaine I de NS5A. (Lindenbach et Rice, 2005).....	38
Figure 18 : Modélisation de NS5B dans un modèle « main droite » avec les doigts, le pouce et la palme. (Lindenbach et Rice, 2005).....	38
Figure 19 : Initiation de la traduction des ARN « coiffés ». (Sachs <i>et al.</i> , 1997).....	39
Figure 20 : Comparaison entre une initiation de traduction interne et cap dépendante.....	40
Figure 21 : Séquence et structure de l'IRES du VHC. (Tan <i>et al.</i> , 2002)	41
Figure 22 : Modèle de l'initiation de la traduction du VHC. Adapté de (Otto et Puglisi, 2004)	42
Figure 23 : Représentation schématique de la région 3' non codante du VHC. (Yanagi <i>et al.</i> , 1999).....	43
Figure 24 : Cycle cellulaire du VHC. ©Tibotec.com	45
Figure 25 : Schéma de la réplication du VHC.....	46
Figure 26 : Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques d'une partie de NS5B chez des individus infectés provenant des 5 continents. (Fang <i>et al.</i> , 1997).....	47
Figure 27 : Distribution génotypique du VHC. (Fang <i>et al.</i> , 1997).....	48
Figure 28 : Dessin d'un Tupaïa. © tolweb.org - Joseph Smit.....	49
Figure 29 : Foie de souris (A) normal, (B) uPA +/- et (C) uPA +/+. (Meuleman, 2006).....	50
Figure 30 : Alignement des génomes du VHC et du GBV-B. (Martin <i>et al.</i> , 2003).....	50
Figure 31 : Représentation schématique de l'organisation du génome du VHC (a) et d'un réplicon sous-génomique (b). (Bartenschlager, 2002).....	53
Figure 32 : Établissement de clones cellulaires comportant des réplicons HCV auto répliquant. (Bartenschlager, 2002).....	54

Figure 33 : Localisation des mutations adaptatives sur les structures en trois dimensions de l'hélicase NS3 (A) et de l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B (B). (Lohmann <i>et al.</i> , 2001).....	54
Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation génomique du VHC et des réplicons dérivés. (Bartenschlager, 2005).....	55
Figure 35 : Génération des virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectiosité <i>in vivo</i> . (Bukh et Purcell, 2006).....	57
Figure 36 : Le système des pseudo-particules virales. (Chapel <i>et al.</i> , 2006b).....	58
Figure 37 : Exemple d'un système bicistronique. (Lerat <i>et al.</i> , 2000).....	58
Figure 38 : Étapes majeures de la recherche sur le VHC. (Manns, 2006)	59
Figure 39 : Résumé schématique du Système IFN. (Samuel, 2001).....	60
Figure 40 : Déclenchement de l'activation de IRF-3 par le VHC <i>via</i> RIG-1 ou TLR-3 et contrôle du signal par NS3-4A. (Gale et Foy, 2005).....	62
Figure 41 : Processus moléculaires signalant à l'hôte une infection du VHC. (Gale et Foy, 2005).....	63
Figure 42 : Récepteurs et signaux de transduction des IFN - $\alpha/\beta,\gamma$ et λ . (Vilcek, 2003)	65
Figure 43 : Action antivirale de l'IFN. (Samuel, 2001).....	67
Figure 44 : Le VHC atténue les signalisations <i>via</i> l'IFN <i>via</i> de multiples mécanismes. (Gale et Foy, 2005)	69
Figure 45 : Modèle de diminution des niveaux d'ARN VHC au cours de la thérapie de l'hépatite C chronique. (Feld et Hoofnagle, 2005).	70
Figure 46 : Structures chimiques de la ribavirine et de la guanosine	71
Figure 47 : Mécanismes d'action proposés de la ribavirine dans l'infection VHC. (Feld et Hoofnagle, 2005).....	71
Figure 48 : Évolution du taux de réponse virologique soutenue (RVS) avec les traitements contre l'hépatite C. (Smith, 2006).	73
Figure 49 : Cibles envisageables dans le développement d'antiviraux. (Tan <i>et al.</i> , 2002).....	74
Figure 50 : L'albiféron est un polypeptide unique qui combine l'albumine et l'interféron. HGS (Human Genome Science) & Novartis.....	75
Figure 51 : Stratégie d'évolution dirigée de nouveaux gènes d'interféron alpha de Maxygen. (Katze <i>et al.</i> , 2002).....	76
Figure 52 : Autoradiographies de rats après traitement avec de la ribavirine ou de la viramidine marquée au Carbone 14. (Wu <i>et al.</i> , 2003)	77
Figure 53 : Désamination de la viramidine en ribavirine par l'ADA. (Wu <i>et al.</i> , 2003).....	77
Figure 54 : Mécanismes d'action de différents immunosucres dans le modèle du BVDV. (Chapel <i>et al.</i> , 2006b).....	78
Figure 55 : Structures des inhibiteurs BILN 2061 et VX-950 de la serine protéase NS3 (en vert) complexée avec le domaine central de NS4A (en rouge). (De Francesco et Migliaccio, 2005).....	79
Figure 56 : Deux vues en trois dimensions du complexe protéase NS3 - SCH503034 (Malcolm <i>et al.</i> , 2006).....	80
Figure 57 : Mécanisme schématique de l'hélicase. (Kim, 1998).....	80
Figure 58 : Modélisation de NS5B avec les sites de fixation des inhibiteurs non nucléosidiques (NNI) les plus connus. (De Francesco et Migliaccio, 2005)	82
Figure 59 : La polymérase NS5B (De Francesco <i>et al.</i> , 2003).	82
Figure 60 : La cyclophiline B, un régulateur fonctionnel de NS5B. (Rice et You, 2005).....	83
Figure 61 : Contrôle putatif de la virémie VHC aiguë par des anticorps neutralisants. (Houghton et Abrignani, 2005) adapté de (Lavillette <i>et al.</i> , 2005).....	84
Figure 62 : Cinétiques d'ARN du VHC (rouge), des ALAT et GGT (en bleu et vert) et de la réponse anticorps VHC spécifique chez des chimpanzés vaccinés ou non. (Folgori <i>et al.</i> , 2006)	85
Figure 63 : La stimulation de TLR distincts sur des cellules dendritiques déclenche différents profils de cytokines et différentes réponses immunitaires. (Pulendran et Ahmed, 2006).....	86
Figure 64 : Schéma de l'action d'un antisens	87
Figure 65 : Du gène à la protéine, cibles des ODN. (Crooke, 1999).....	88

Figure 66 : Schéma de fonctionnement de la RNase H. (Crooke, 2004)	88
Figure 67 : ADN vs Phosphorothioates (PS-ODN).....	91
Figure 68 : Facteurs affectant la spécificité des antisens et les stratégies employées pour y remédier. (Agrawal et Kandimalla, 2000)	93
Figure 69 : Structures des principaux oligonucléotides antisens de deuxième génération. (Baker et Monia, 1999)	94
Figure 70 : Proportion d'agents ciblant l'ARNm dans chaque phase de développement clinique. (Winkler, 2004).....	94
Figure 71 : Structure d'un ribozyme à tête de marteau. (Phylactou, 2000).....	96
Figure 72 : Réparation d'une molécule d'ARN <i>via</i> un ribozyme de type intron de groupe I. (Phylactou, 2000).....	96
Figure 73 : Génération et applications des aptamères. (Breaker, 2004)	98
Figure 74 : Utilisation de l'interférence ARN comme stratégie antisens. (Carmichael, 2002)	99
Figure 75 : Mécanismes principaux d'action des stratégies antisens sur le VHC. (Trepanier <i>et al.</i> , 2006b).....	100
Figure 76 : Représentation en diagramme du VHC montrant la diversité du génome entre les génotypes. (Simmonds, 2004a)	100
Figure 77 : Comparaison des structures chimiques des PNA et de l'ADN. (Lundin <i>et al.</i> , 2006).....	103
Figure 78: Modèles de liaison des PNA aux doubles hélices et à l'ARN. (Lundin <i>et al.</i> , 2006).....	104
Figure 79 : Stratégies d'utilisation des PNA.....	104
Figure 80 : Représentation schématique du déplacement du double brin d'ADN par un PNA homopyrimidique <i>via</i> les liaisons hydrogène de Watson & Crick et de Hoogsteen.	105
Figure 81 : Représentation schématique de la formation d'un complexe PNA/microsphère. (Chiarantini <i>et al.</i> , 2005)	108
Figure 82 : Représentation schématique de la charge d'érythrocytes avec des PNA. (Chiarantini <i>et al.</i> , 2005)	108
Figure 83 : (A) Couplage d'un PNA au TPP, une molécule lipophile (B) et modèle de pénétration dans la cellule. (Filipovska <i>et al.</i> , 2004)	109
Figure 84 : Relation phylogénétique déduite du panel de population de GenOdysée. Adapté de : (Cavalli-Sforza <i>et al.</i> , 1994)	125
Figure 85 : Inhibition de l'ARN sous-génomique du VHC (lignée BM4-5) par les IFN- α , β , et γ	127
Figure 86 : (A) SDS-PAGE après traduction en lysat de réticulocytes et marquage des protéines à la Met [35 S] (B) Comparaison des efficacités relatives de traduction en RRL (Données non publiées).....	151
Figure 87 : Northern Blot contre l'ARN pFI-hRI-NR1 avec une sonde ADN dirigée contre hRenilla et marquée au dCTP α^{32} P.	152
Figure 88 : Représentation schématique d'un complexe boucle-boucle. (Toulme <i>et al.</i> , 2003).....	169

V - LISTE DES ABREVIATIONS

5'UTR : région 5' non traduite
AA : Acide Aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALAT : Alanine aminotransférase (ALAT)
AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNi : interférence ARN ou ARN interférent
BVDV : Virus de la Diarrhée Bovine
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CMV : Cytomégalovirus
CpG : Deoxycytosine-deoxyguanosine
DC : Cellules dendritiques
DGV : Dépistage Génomique Viral
eIF3 : Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 3
EMCV : Virus de l'encéphalomyocardite
IMPDH : Inosine Monophosphate Déshydrogénase
InVS : Institut National de Veille Sanitaire
IRES : Internal Ribosome Entry Site
IRF : Interferon Responding Factors
JFH1 : Japanese Fulminant Hepatitis 1
LNA : Locked Nucleic Acid
MBO : Mixed Backbone Oligonucleotide
ODN : Oligodésoxynucléotides
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBMC : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique
PKA : Protéine Kinase A
PKR : Protéine Kinase R
PNA : Peptide Nucleic Acid
PS-ODN : Oligodésoxynucléotides de type Phosphorothioates
RdRP : ARN Polymérase ARN dépendante
RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-I : Retinoic-acid Inducible Gene 1
RISC : RNA Induced Silencing Complex
RNase H : Ribonucléase H
RTP : Ribavirine Triphosphate
RVS : Réponse Virologique Soutenue
SCID : Severe Combined Immunodeficiency
shRNA : small hairpin RNA (ARN en « petite épingle »)
siRNA : small interfering ARN (petit ARN interférent)
TLR : Toll-Like Receptors
Tm : Température de fusion
VHC : Virus de l'hépatite C
VHCpp : pseudos particules VHC
VIH : Virus de l'Immunodéficiência Humaine

Introduction générale

Découvert en 1989, le virus de l'hépatite C (VHC) infecte environ 3% de la population mondiale. On estime le nombre de porteurs de l'hépatite C chronique à 175 millions de personnes dans le monde. Ils sont ainsi exposés aux risques de complications, qu'ils s'agissent du développement d'une cirrhose ou de l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire. C'est aujourd'hui la cause majoritaire de transplantations hépatiques en Europe et aux USA. **L'hépatite C représente donc un problème majeur de santé publique.**

Le traitement actuel de l'hépatite C repose sur l'association d'interféron alpha pégylé et de ribavirine. Il permet une réponse virologique soutenue chez environ 55% des patients, tous génotypes confondus. Ce chiffre masque en réalité d'importantes variations selon le génotype viral (50% de réponse pour les génotypes 1 contre 80% de réponse pour les génotypes 2 et 3) et dépend, entre autres, de nombreux facteurs de l'hôte tels que son âge, son sexe ou de l'existence d'une maladie hépatique. Les effets secondaires du traitement par la bithérapie sont importants. Il s'agit essentiellement d'un syndrome pseudo-grippal accompagné d'une dépression pour l'interféron et d'anémie pour la ribavirine, ce qui pose un important problème de compliance au traitement qui doit durer entre 6 et 12 mois pour être efficace. De nombreux efforts sont entrepris pour essayer d'améliorer les traitements actuels et pour développer de nouvelles molécules, notamment des anti-protéases et anti-polymérase et à terme de mettre au point un vaccin. Des difficultés sont cependant à prévoir. Compte tenu de la nature hautement adaptative et évolutive du VHC, ces futures thérapies devront être envisagées en combinaisons afin de diminuer la probabilité d'apparition de souches résistantes, comme cela a été observé avec le VIH ou le VHB.

Le frein majeur dans ces recherches a été l'absence de modèle expérimental de réplication du VHC en culture de cellules. Jusqu'à très récemment (juin 2005), les seuls outils d'études étaient des cultures primaires de cellules hépatocytaires, l'étude de virus apparentés ou des systèmes de réplication de sous-génomiques. Les cultures primaires de cellules, isolées chez des patients infectés, sont difficiles à obtenir et à standardiser. L'étude de virus apparentés est déjà plus facile et a permis par exemple avec le virus de la diarrhée bovine de réaliser des avancées importantes au niveau du cycle de réplication. L'apparition en 1999 de systèmes de réplication sous-génomiques, le système du réplicon VHC, a permis de réaliser des progressions importantes en permettant notamment de tester des composés dirigés contre les enzymes virales. Il manquait cependant la possibilité d'étudier le virus dans sa globalité avec notamment les phases d'entrée et de morphogénèse virale et de pouvoir travailler sur des particules virales complètes. C'est aujourd'hui possible avec le système de réplication complet développé à partir d'un isolat viral d'une hépatite fulminante et qui permet la production expérimentale de particules virales. Gageons que ce dernier modèle va permettre de réaliser des avancées majeures tant sur le plan théorique que pratique pour les patients.



Mon travail de doctorat s'inscrit dans ce contexte, avec comme objectif, à terme, de développer de nouvelles approches antivirales contre le virus de l'hépatite C.

La première partie des études a consisté à évaluer de **nouveaux interféron alpha** identifiés par sélection de variants naturels en montrant leur supériorité par rapport aux interférons utilisés en clinique.

Nous avons ensuite cherché à montrer qu'une **approche antisens de type Peptide Nucleic Acid (PNA)** pouvait inhiber la réplication du VHC mais que son utilisation clinique n'était pas assurée.

Ces études ont été réalisées sur des modèles *in vitro* et dans le modèle des réplicons sous-génomiques du VHC.

Données bibliographiques

I - LE VIRUS DE L'HEPATITE C : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

A - ÉPIDEMIOLOGIE DE L'HEPATITE C

1 - PREVALENCE DE L'INFECTION

L'estimation de la prévalence de l'infection par le VHC en population générale reste difficile et imprécise notamment du fait de la non-représentativité de la majorité des échantillons de population étudiés. En 1999, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait qu'environ 3% de la population mondiale était infectée par le virus de l'hépatite C et qu'au moins 170 millions de porteurs chroniques du virus étaient ainsi exposés aux risques de complications (1999; Vaccines, 1999). Des données plus récentes rapportent une prévalence légèrement inférieure et voisine de 2,2% (Shepard *et al.*, 2005).

La **distribution géographique** est variable avec des zones à prévalence très élevée comme en Afrique ou en Asie où la prévalence peut dépasser 10% et des régions de basse endémie telles que l'Amérique du Nord ou l'Europe Occidentale avec une prévalence voisine de 1% (Figure 1). L'Europe et l'Amérique du Nord compteraient environ 22 millions de sujets séropositifs pour le VHC contre 147 millions pour le reste du monde dont 32 millions en Afrique.

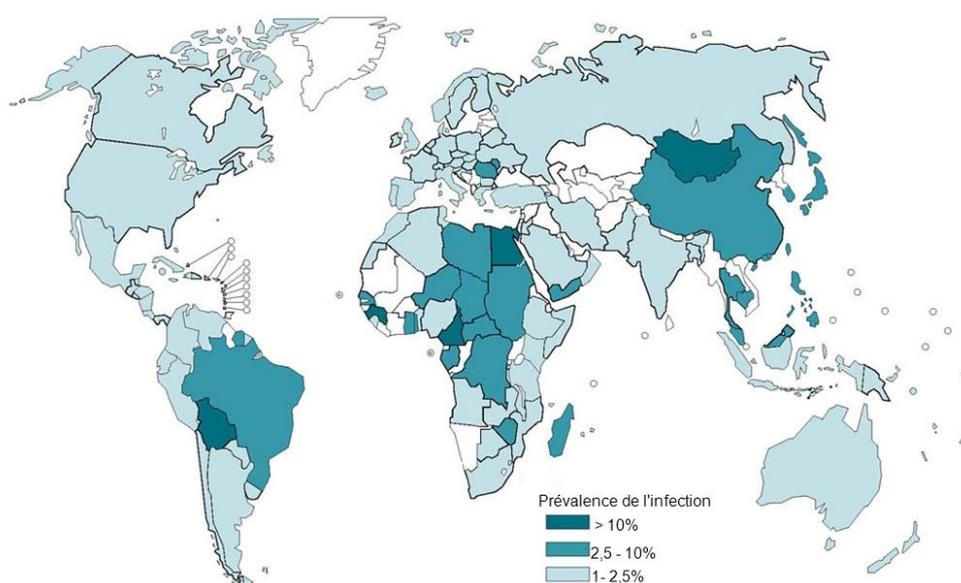


Figure 1 : Prévalence de l'infection par le VHC estimée par l'OMS en 2003. (Shepard *et al.*, 2005)

EN EUROPE

Il existe, tout comme pour le virus de l'hépatite B, un gradient de prévalence Nord-Sud. Dans les pays du Nord, la prévalence est voisine de 0,5%, alors qu'elle est estimée à 2% dans les pays du pourtour méditerranéen. Ce gradient serait lié à la variation du taux de transmission par transfusion et à l'usage de drogue qui demeure plus important dans les pays du Sud.

EN FRANCE

La première grande étude de prévalence publiée en 1997 estimait que 1,2% de la population était infectée par le virus de l'hépatite C, ce qui représenterait environ 500 000 à 600 000 personnes (Dubois *et al.*, 1997). Une autre étude conduite chez près de 7 000 patients de médecine générale rapportait une prévalence semblable de l'ordre de 1,3% (Desenclos *et al.*, 1996). Plus récemment, une étude conduite chez 14 400 assurés sociaux du régime général âgés de 18 à 80 ans rapporte une prévalence globale de 0,86%, avec des variations allant de 1,26 % pour la région PACA et 0,34 % dans le quart nord-ouest. Dans cette étude, 56% connaissaient leur statut sérologique contre 24% en 1994. (Meffre *et al.*, 2005).

ÉVOLUTION

Les estimations de la prévalence par classes d'âge entre les années 1990 et 2000 indiquent une diminution globale des taux de prévalence et un déplacement du pic épidémiologique de 35 ans il y a 10 ans vers 45 ans aujourd'hui (Figure 2).

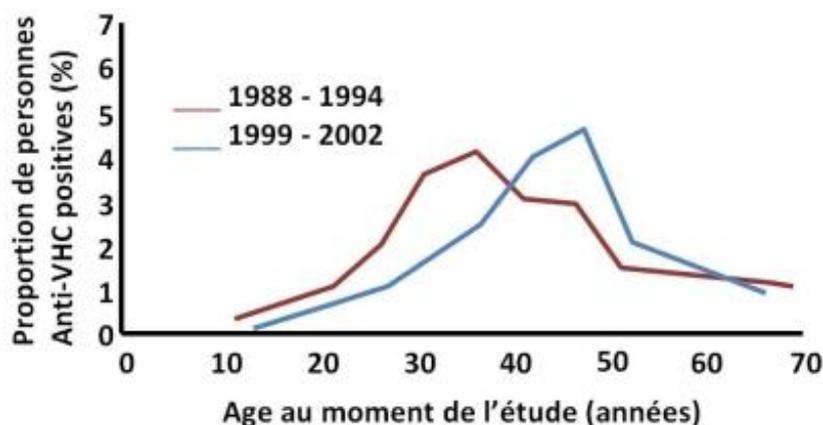


Figure 2 : Estimation du taux de prévalence des anticorps anti-VHC en 1988-1994 et 1999-2002 dans la population américaine et en fonction de l'âge. (Armstrong *et al.*, 2006)

Dans les pays développés, l'incidence de l'infection au VHC a donc diminué au cours des dix dernières années, une tendance qui est confirmée en France (Meffre *et al.*, 2005). Les mesures de précaution (que nous détaillerons plus loin) ont fonctionné et le nombre de nouveaux cas dans la population générale est désormais très faible. Dans les pays en voie de développement cette tendance ne se confirme pas.

2 - MODE DE TRANSMISSION

La transmission du VHC est essentiellement parentérale et résulte de la mise en contact direct du sang d'un sujet indemne avec celui de la personne exposée. Historiquement, trois grandes vagues de dissémination se sont succédées, initialement via les **activités de soins** par les aiguilles et seringues réutilisables non stérilisées, puis par la **transfusion** et ensuite par la diffusion de la **toxicomanie** intraveineuse. Dans les pays développés, on estime que 90% des porteurs chroniques du virus sont ou étaient des consommateurs de drogues injectables ou ont été transfusés avec des produits sanguins contaminés. Dans beaucoup de pays en développement, les principaux modes de transmission restent liés à l'usage de matériel d'injection non stérile et à la transfusion de sang ou de produits sanguins non testés.

De manière globale, le VHC est un « produit du XXème siècle », du fait de **l'évolution de la médecine** (transfusions, solutions i.v. commerciales, vaccination, soins dentaires, endoscopies...) et des **comportements sociaux** comme l'usage des drogues injectables ou le développement des tatouages, piercings...

2.1 - TRANSMISSIONS PARENTERALES

2.1.1 - TRANSFUSIONS SANGUINES

La transfusion sanguine a été la première cause reconnue et a joué un rôle majeur pour la diffusion de l'infection jusqu'en 1990 (Alter *et al.*, 1989; Donahue *et al.*, 1992). Le nombre de sujets infectés par voie intraveineuse en France au cours des dernières décennies a été estimé entre 200 000 et 400 000. Les produits en cause étaient surtout des produits labiles (globules rouges, plaquettes et fractions coagulantes) et des produits stables (médicaments dérivés du sang). La mise en application de mesures réglementaires spécifiques ont permis de considérablement réduire l'incidence de ces hépatites transfusionnelles (Pillonel et Laperche, 2001).

MESURES VISANT A REDUIRE L'INCIDENCE DES HEPATITES POST-TRANSFUSIONNELLES :

- Eviction des donneurs ayant une valeur d'alanine aminotransférase (ALAT) deux fois supérieure à la normale et contenant des anti-HBc (1988)
- Elimination des unités de sang contenant des anticorps anti-VHC par les tests de première génération (mars 1990) puis de deuxième génération (mars 1991)
- Eviction des donneurs dont la valeur d'ALAT est supérieure à la limite supérieure de la normale (1992)
- Utilisation des tests anti-VHC de troisième génération (1993)
- Sélection clinique stricte des donneurs, allant jusqu'à l'élimination de tout sujet ayant des antécédents transfusionnels ou ayant eu une endoscopie dans les six mois précédant le don (1997)
- Dépistage génomique viral (DGV), i.e. la recherche d'ARN du VHC dans le sang (2001)



Figure 3 : Évolution du risque résiduel estimé de transmission d'infections virales par transfusion en France entre 1992 et 2002. (Pillonel et Laperche, 2003)

En 2003, avec le DGV, le risque d'hépatite post-transfusionnelle du VHC est estimé à 1 pour 6 650 000 dons, ce qui, en l'absence d'erreur humaine, devrait être à l'origine de moins de 1 nouveaux cas tous les 2,5 ans, à comparer à un risque qui était de 1 pour 1700 dons en 1990 (Pillonel et Laperche, 2003).

2.1.2 - TOXICOMANIE PAR VOIE INTRAVEINEUSE

Cette modalité de diffusion a explosé à partir des années 1960 dans une population jeune et masculine (Roudot-Thoraval *et al.*, 1997). Compte tenu des pratiques initiales de partage des seringues avant l'épidémie de VIH, la prévalence chez les anciens usagers de drogues intraveineuses était de l'ordre de 50 % à 80 % (Foutrein *et al.*, 1993). On estime en France que dans le passé, 200 000 à 300 000 porteurs chroniques actuels du VHC ont été contaminés par la toxicomanie.

Aujourd'hui, contrairement à ce que l'on a observé pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), les mesures prises pour réduire cette endémie (vente libre des seringues en pharmacie dès 1987, traitements de substitutions) n'ont pas entraîné une baisse du risque de transmission du VHC chez les toxicomanes (Figure 4). Une étude Française récente montre que 20% des usagers de drogues de moins de 30 ans sont contaminés pour le VHC

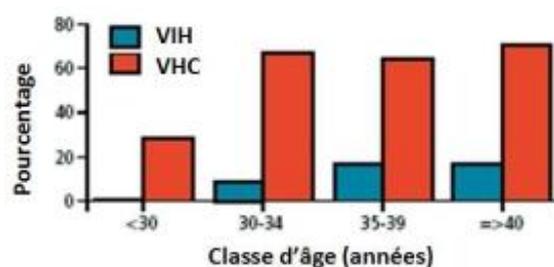


Figure 4 : Séroprévalence du VIH et du VHC par classe d'âge en France. (Jauffret-Roustide *et al.*, 2006)

Ceci pourrait s'expliquer en particulier par la **plus grande résistance du VHC** et une possibilité de **contamination en dehors de l'usage de la voie intraveineuse**, en particulier via le partage des pailles servant à inhaler la cocaïne (Conry-Cantilena *et al.*, 1996) et surtout par une transmission au moment du premier usage de drogue par une personne plus âgée. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse avec le VHB qui est plus résistant que le VHC. L'impact de la sensibilisation et de la prévention reste cependant très net si l'on compare la population âgée de plus de 30 ans avec celle de moins de 30 ans qui a bénéficié de campagnes de sensibilisation.

Une étude estime que, compte tenu du nombre de sujets encore exposés à l'infection (24 000 à 40 000 sujets séronégatifs) et de l'incidence annuelle de séroconversion (environ 10 %), il pourrait y avoir 2 700 à 4400 nouveaux cas annuels d'hépatite C par toxicomanie (Emmanuelli, 2002).

2.1.3 - TRANSMISSION NOSOCOMIALE

Le rôle joué par la contamination nosocomiale est difficile à évaluer. En excluant les transplantations d'organes et de tissus qui sont une source évidente de contamination, de nombreuses études ont mis en évidence la transmission nosocomiale du VHC. Des travaux ont documenté le risque de transmission lié aux **endoscopies invasives** (digestives, pulmonaires ou urologiques) ; l'utilisation des **auto-piqueurs** pour diabétiques a également été incriminée et des transmissions dans des centres d'**hémodialyse** ont été mises en évidence.

La transmission nosocomiale a été très fréquente lorsque les injections étaient effectuées avec du matériel mal stérilisé ou à usage multiple (l'abandon des seringues en verre ne s'est fait en France qu'à partir des années 1970 et plus tard dans d'autres pays méditerranéens). Le rôle des actes chirurgicaux est bien documenté et la transmission de médecins vers les patients paraît exceptionnelle (Desenclos, 2003; Shepard *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, le strict respect des règles d'hygiène universelles, des recommandations de désinfection du matériel médical non jetable et le développement du matériel à usage unique devraient permettre à terme une quasi-disparition de ce type de risque nosocomial (Roudot-Thoraval, 2001).

2.2 - AUTRES MODES DE TRANSMISSION

2.2.1 - TRANSMISSIONS PAR INJECTIONS THERAPEUTIQUES

La prévalence élevée de l'infection par le VHC dans les pays en voie de développement s'explique avant tout par une transmission survenue lors d'injections effectuées dans le cadre de **campagnes de traitement ou de prévention de masse**. Le cas le plus documenté est celui de l'Égypte, pays qui détient le record de la séroprévalence VHC la plus élevée au monde avec plus de 7,5 millions de porteurs du virus, soit près de 10% de la population. On retrouve une corrélation directe entre l'infection par le VHC et les campagnes de traitement de la bilharziose entre 1960 et 1987 (Frank *et al.*, 2000) qui explique la cause initiale de propagation du virus (Radi, 2006).

Dans cet exemple illustré par la Figure 5, le taux et la distribution géographique de la prévalence des anticorps anti-VHC correspond à la distribution de la bilharziose au cours du siècle, une maladie liée à un parasite qui se développe dans les zones humides. Ainsi la basse Égypte (au nord, région humide du Delta) a toujours eu des taux élevés d'infection à la bilharziose. En haute et moyenne Égypte, la prévalence a augmenté en raison de la construction du grand barrage qui, en éliminant les crues, a augmenté les quantités d'eau stagnante. Les habitants des villes (Alexandrie et la Caire) ont toujours eu des taux inférieurs de bilharziose, ce qui corrèle avec une prévalence plus faible pour le VHC.



Figure 5 : Taux de prévalence pour les anticorps anti-VHC dans la population Égyptienne entre 10 et 50 ans, selon les régions. (Frank *et al.*, 2000)

Plus généralement, des estimations réalisées par l'OMS de la transmission du VHC par les injections à risque dans les pays en développement indiquent que **2,3 à 4,7 millions d'infections** soit 45% des nouvelles infections (Figure 6) surviendraient encore annuellement suite à de telles injections (Hauri *et al.*, 2004). Conscient de ce problème, l'OMS coordonne depuis 1999 un réseau mondial pour des injections propres (SIGN) qui vise à faire changer les comportements à risques comme la réutilisation de seringues, phénomène encore très développé au moyen orient, dans le sud-est asiatique et dans la région pacifique occidentale (Hutin et Chen, 1999).

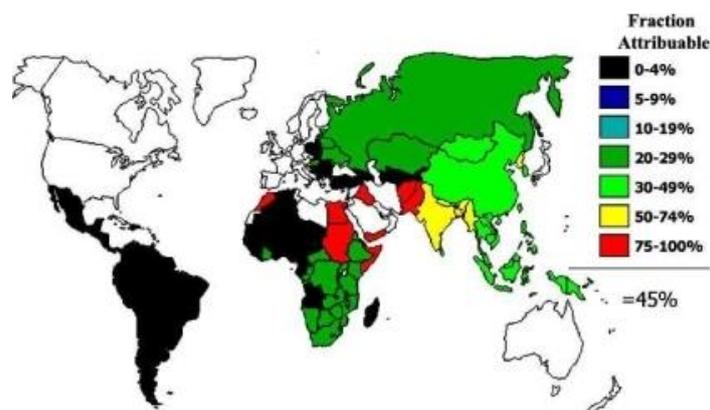


Figure 6 : Proportion de nouvelles infections au VHC attribuables à des injections non sûres. (OMS - 2000)

2.2.2 - TRANSMISSION PROFESSIONNELLE

Elle est estimée à 3% après une piqure accidentelle et est susceptible d'atteindre 10% lorsque la virémie est très élevée. Fort heureusement, on assiste à une réduction de la fréquence des cas en raison des précautions préconisées dans la lutte contre le VHC. En France, les dernières données disponibles, illustrées par la Figure 7, montrent un nombre de séroconversion professionnelle autour de 2 cas par année (Lot *et al.*, 2005).

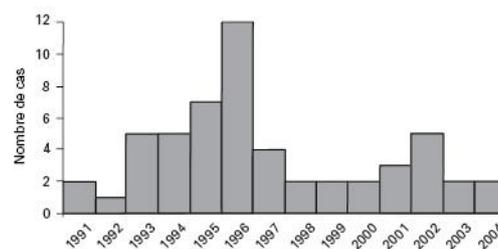


Figure 7 : Nombre de séroconversions professionnelles VHC chez le personnel de santé selon l'année de l'Accident Exposant au Sang (AES), France, situation au 31/12/2004. (Lot *et al.*, 2005)

2.2.3 - TRANSMISSION FAMILIALE

La transmission familiale du VHC correspond en fait à trois modes mineurs de contamination différents : entre partenaires sexuels, intra-familiale et mère-enfant.

La **transmission sexuelle** est très faible, mal documentée et mal comprise. En effet, le VHC n'est présent qu'à l'état de traces dans les sécrétions sexuelles et les risques de transmission au sein des couples stables en l'absence d'une co-infection VIH semblent exceptionnels à partir de porteurs chroniques. Dans le cas de contamination de partenaires, on peut s'interroger sur un facteur de risque commun au couple (toxicomanie,...) ou sur les risques liés au partage d'objets de toilette contaminés (Zylberberg *et al.*, 1999).

La **transmission intra-familiale** pourrait être liée au partage d'objets de toilette responsable de petites plaies (rasoirs, brosses à dents). Des conditions de forte promiscuité et des d'hygiènes défectueuses seraient des éléments favorisant. Dans des conditions normales d'hygiène et en vue de la rareté de cette voie de transmission, aucune précaution spécifique n'est recommandée en France. Toutefois, avec l'augmentation de la sensibilité des techniques de détection, les données semblent évoluer. Une étude récente a identifié des traces du VHC dans la salive de 62% de patients atteints par une hépatite C chronique (Karmochkine *et al.*, 2006). Ceci reste à confirmer mais permettrait d'expliquer des cas non expliqués de transmissions.

Enfin, la **transmission mère-enfant** a été bien démontrée mais le risque est faible et estimé à moins de 5% en l'absence de co-infection (dans ce cas le risque peut atteindre 20%). La contamination semblant survenir au moment de l'accouchement, il est possible de la prévenir en pratiquant des césariennes exsangues. L'allaitement n'apparaît pas comme un risque de transmission et n'est donc pas contre indiqué chez les femmes porteuses du VHC (Airoldi et Berghella, 2006).

2.2.4 - AUTRES VOIES DE TRANSMISSION

Dans environ **20% des cas** en France, l'origine de la transmission reste inconnue. Certaines voies de transmission qui peuvent être importantes comme, par exemple, lors de certaines pratiques sociales, culturelles ou impliquant une effraction cutanée sont connues. A ce titre, la scarification, la circoncision, les tatouages et piercings... sont des pratiques à risque lorsque les instruments sont mal stérilisés. Parfois le malade peut dissimuler un facteur de risque (usage de drogue) ou simplement ne pas le connaître (transfusion ancienne, soin médical dentaire, vaccination de masse). Il est peut être intéressant de rappeler ici que le VHC ne se transmet pas par les éternuements ou la toux, les accolades, baisers ou poignées de main ainsi que par l'eau et les aliments.

B - HISTOIRE NATURELLE DE L'INFECTION PAR LE VHC

L'histoire naturelle de l'hépatite chronique C est l'objet de controverses. Selon les auteurs, il s'agit d'une maladie évoluant inexorablement avec une forte probabilité de survenue de cirrhose, de carcinome hépatocellulaire (CHC) et une forte mortalité. Pour d'autres, l'hépatite C évolue de manière très variable selon les malades et est associée à un risque faible de cirrhose et des complications qui ne se manifeste en tout cas qu'à long terme et influence peu l'espérance de vie.

Ces différences d'appréciation sont en grande partie liées à :

- la manière d'**analyser les études disponibles** (prospectives, rétrospectives ou mixtes),
- la difficulté de connaître avec certitude le **début de l'infection** (l'évolution chronique se fait à « bas bruit » ce qui, en l'absence d'un dépistage fortuit, est responsable d'une prise en charge tardive des patients)
- au caractère très **progressif** de la maladie
- au **virus** lui-même. Comme nous le verrons plus tard, certains génotypes s'accompagnent d'un plus mauvais pronostic que d'autres.

Les **étapes successives de l'histoire naturelle** de l'infection par le virus de l'hépatite C (Figure 8) sont par contre bien connues :

- La contamination par le VHC entraîne une **hépatite aiguë** et la plupart des sujets infectés restent porteurs chronique du virus.
- La persistance de l'infection virale entraîne l'apparition de lésions d'**hépatite chronique** et le développement d'une **fibrose**, aboutissant en général à une **cirrhose** plusieurs années après.
- Le **carcinome hépatocellulaire** survient en général au stade de la **cirrhose** et est responsable de la mortalité de l'affection.

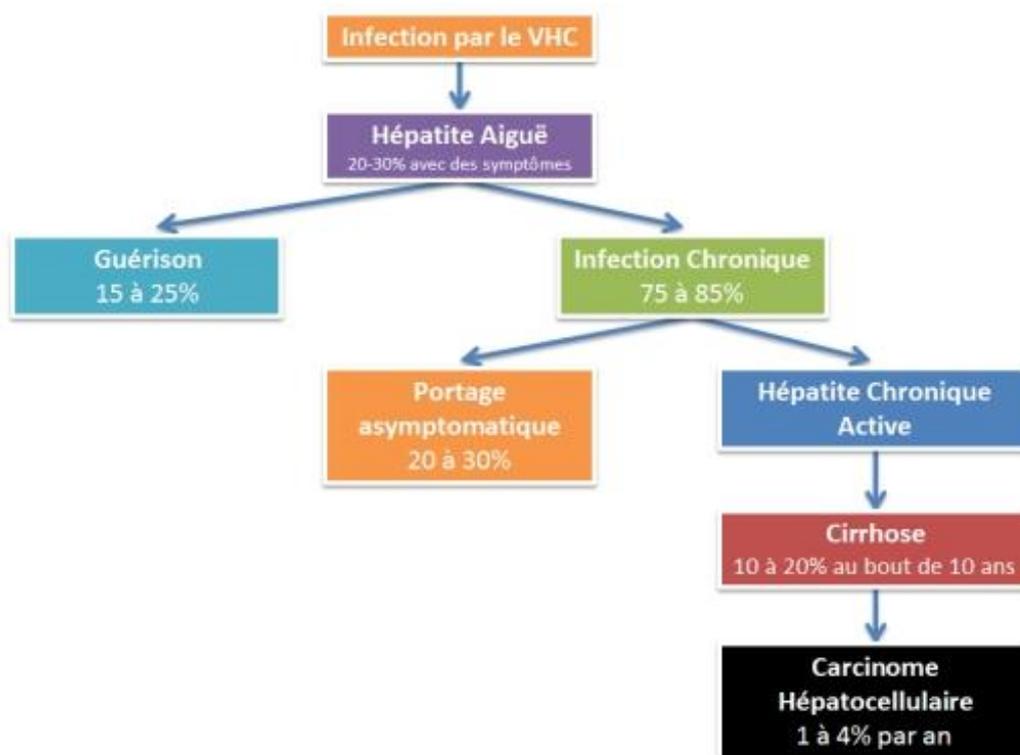


Figure 8 : Schéma de l'évolution d'une infection par le VHC. (Chen et Morgan, 2006)

1 - INFECTION AIGUË

On estime que le VHC est responsable de 20 % des cas d'hépatites aiguës, habituellement asymptomatiques, ce qui explique que le diagnostic soit rarement fait à ce stade de la maladie. Les caractéristiques de l'hépatite C aiguë ont surtout été décrites chez les malades transfusés (Alberti *et al.*, 1999).

Le déroulement de l'infection aiguë peut être résumé ainsi:

- **L'ARN du VHC** est le premier marqueur détectable dans le sérum, 1 à 3 semaines après la contamination. La virémie maximale est atteinte 6 à 10 semaines plus tard. Dans l'hypothèse où la virémie n'est pas contrôlée (Figure 9a), l'infection va devenir persistante.
- Si l'individu réagit à l'infection, les **transaminases sériques** augmentent (pour devenir supérieures à dix fois la normale) au-delà de la deuxième semaine après l'infection, témoignant d'une atteinte hépatique.
- Des **symptômes cliniques** peuvent être observés (dans 10% des cas).
- Les **anticorps anti-VHC** apparaissent dans le sérum 20 à 150 jours après la contamination. Cette séroconversion est l'élément majeur du diagnostic de l'infection aiguë, la positivité de l'ARN sérique, habituelle à ce stade, ne permettant pas de distinguer une infection aiguë d'une infection chronique.

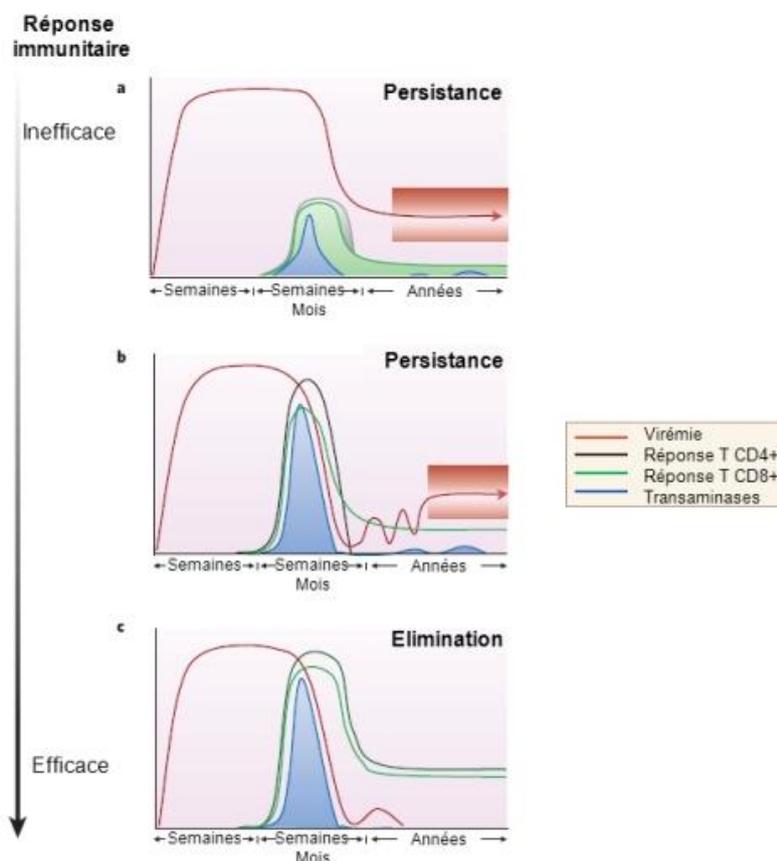


Figure 9 : Réponses immunitaire au cours d'une infection VHC aiguë. (Bowen et Walker, 2005)

A la suite de l'hépatite aiguë, la plupart des sujets évoluent vers une **infection chronique** (Figure 9b). Elle se définit par la persistance de l'ARN du VHC détectable dans le sérum entre 3 et 6 mois après l'hépatite aiguë ; cela est le cas dans 75 % à 85 % des infections.

Pour les 15 % à 25 % restants, une **guérison spontanée** se produit (Figure 9c). Elle s'accompagne d'une normalisation des transaminases, d'une disparition de l'ARN viral qui devient indétectable et d'un titre en anticorps anti-VHC qui diminue lentement au cours des dix années suivant l'infection. Il n'est pas clairement établi si, dans ces conditions, l'infection par le VHC est éradiquée ou si une infection latente peut persister en l'absence d'ARN du VHC dans le sérum (Bowen et Walker, 2005).

2 - INFECTION CHRONIQUE

L'hépatite C chronique se définit par la présence dans le sérum d'ARN du VHC pendant plus de 3 à 6 mois après le début de l'infection. Elle survient dans 75% à 85% des cas. Le risque de passage à la chronicité est plus élevé chez les sujets masculins, âgés ou présentant un déficit immunitaire. Lorsque l'épisode aiguë est passé inaperçu, c'est-à-dire dans la majorité des cas, le diagnostic de l'hépatite chronique C se fait souvent tardivement et fortuitement. En effet, l'infection reste souvent asymptomatique malgré l'activité de la maladie et la progression de la fibrose hépatique jusqu'au stade de cirrhose. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques et les variations des transaminases peu importantes.

Des études récentes ont montré que des lymphocytes T CD8+ spécifiques du VHC peuvent survivre pendant des années dans le foie infecté et pourraient, au moins partiellement, participer au contrôle de la réplication virale, contribuant ainsi à une apparition progressive des maladies du foie. Ce sujet reste l'objet de nombreuses controverses quant aux corrélations entre lymphocytes T cytotoxiques intra-hépatiques et la charge virale. De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'évolution de l'hépatite chronique et l'interaction du virus avec l'immunité humorale et cellulaire de l'hôte, études qui permettront de progresser vers la mise au point d'un vaccin ou de nouveaux traitements (Bowen et Walker, 2005).

Comme mentionné en introduction de cette partie, l'évolution de l'hépatite C est controversée et hétérogène selon les individus. Néanmoins, il est admis que la sévérité des lésions hépatiques est liée à la **progression de la fibrose**, aboutissant à une perturbation majeure de l'architecture hépatique qu'est la **cirrhose** (Figure 10).

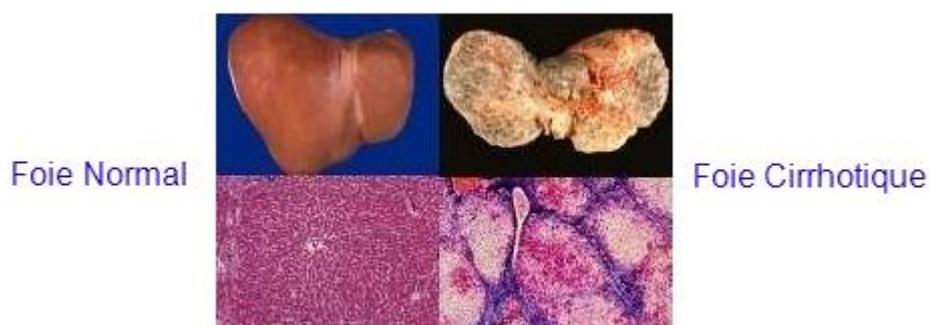


Figure 10 : Comparaison d'un foie normal vs un foie cirrhotique

3 - CIRRHOSE ET CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

L'hépatite C chronique est une cause majeure de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. Aux États-Unis et en Europe, l'hépatite chronique C est la **deuxième cause de cirrhose et de CHC**, après la consommation excessive d'alcool. C'est presque exclusivement à ce stade que surviennent les complications responsables de la morbidité et de la mortalité de la maladie (Poynard *et al.*, 2003).

C'est le dernier stade de la fibrose hépatique qui intervient en général 30 ans après l'infection mais avec beaucoup de variabilité selon les individus. Les **causes de cette variabilité** sont de mieux en mieux identifiées et résumées dans le Tableau 1.

Association certaine	Association probable	Pas d'association
État de la fibrose	Inflammation	Dernière charge virale du sérum
Age lors de l'infection	Hémochromatose hétérozygote	Génotypes non-3
Durée de l'infection	Consommation de tabac	Mode d'infection
Age lors de la biopsie	Consommation modérée d'alcool	Charge virale hépatique
Consommation d'alcool >50 g par jour	Génotype 3	
Coïnfection VIH	Bilharziose	
Nombre de CD4 <200/mL		
Sexe Masculin		
Nécrose		
Index de masse corporelle, diabète, stéatoses		

Tableau 1: Facteurs associés à une progression de la fibrose hépatique chez les patients infectés par le VHC. (Poynard *et al.*, 2003)

Globalement, le risque annuel de décès chez les malades atteints de cirrhose est de l'ordre de 2 à 5%, la plupart de ces décès étant en rapport avec la maladie hépatique qu'il s'agisse d'un CHC ou d'une insuffisance hépatocellulaire terminale. Après une première décompensation cirrhotique, l'espérance de vie à cinq ans chute fortement et devient inférieure à 50% en l'absence de transplantation hépatique.

II - LE VIRUS DE L'HÉPATITE C : DONNEES MOLECULAIRES, MODELES D'ETUDES

A - PRESENTATION VIROLOGIQUE

Le virus de l'hépatite C a été historiquement le premier virus à être identifié par des techniques de biologie moléculaire sans que la particule elle-même ait été isolée. L'hypothèse de son existence découlait de la persistance d'hépatites post-transfusionnelles malgré la mise en place de tests sérologiques pour dépister les infections par le virus de l'hépatite B ; on parlait d'hépatite non A – non B dans les années 1980. C'est à la suite de transmissions expérimentales au chimpanzé puis du clonage de tous les acides nucléiques extraits de son plasma dans une banque de phage lambda et tri par les anticorps sériques d'un patient infecté que le virus a pu être caractérisé, travail réalisé par l'équipe de Michael Houghton en 1989 (Choo *et al.*, 1989).

1 - CLASSIFICATION

L'intégralité du génome viral a été cloné et la comparaison avec les autres séquences virales connues a permis de classer le VHC au sein de la famille des *Flaviviridae*, dans un nouveau genre appelé *Hepacivirus* constitué du VHC et de flavivirus responsables d'hépatites G (GBV-A,-B,-C). Cette famille regroupe des **virus enveloppés** ayant un **génome à ARN monocaténaire de polarité positive**.

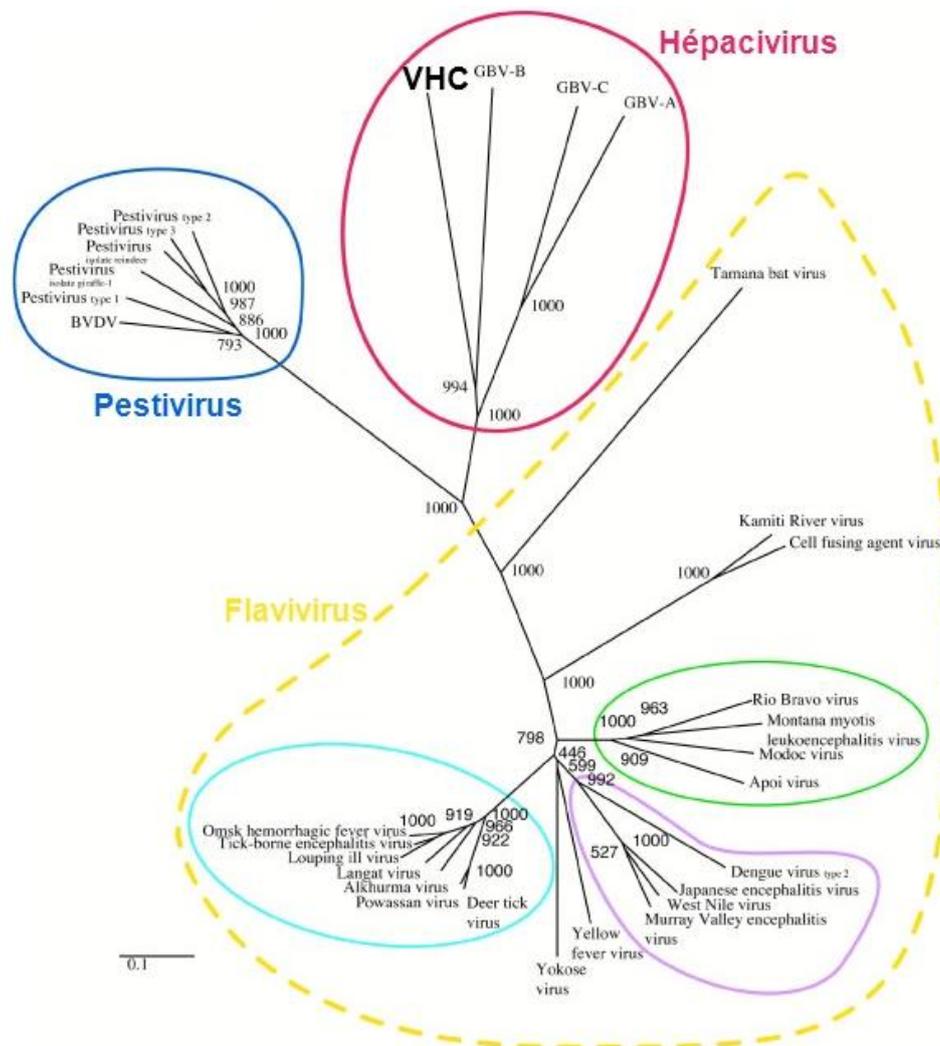


Figure 11 : Place phylogénétique du VHC et des hépacivirus dans la famille des *Flaviviridae*. Arbre réalisé à partir des polymérases virales. (Ferron *et al.*, 2005)

Comme illustré par la Figure 11, la famille des *flaviviridae* regroupe en plus des **hépacivirus**, les **flavivirus** tels que les virus de la fièvre jaune (YF), de la dengue (DEN) ou de l'encéphalite japonaise (JE) et les **pestivirus** responsables de pathologies animales tels que le virus de la diarrhée bovine (BVDV) ou le virus classique de la fièvre porcine (CSFV).

2 - PARTICULE VIRALE

L'analyse de la structure des particules VHC a été rendu difficile par **le faible titre du virus** dans les sera infectieux et les **difficultés à faire se répliquer le virus** en cultures cellulaires. Toutefois les connaissances tendent à s'améliorer avec des études qui rapportent l'observation de particules VHC dans le plasma de patients chroniquement infectés (Petit *et al.*, 2005) et la mise au point de systèmes de répllication *in vitro*.

Le VHC est un petit virus enveloppé de 55 à 65 nm de diamètre. L'ARN est contenu dans une capsidie protéique (C) à symétrie icosaédrique, elle-même située dans une enveloppe lipidique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe virales spécifiques E1 et E2 organisées en complexes hétérodimériques non covalents (Figure 12).

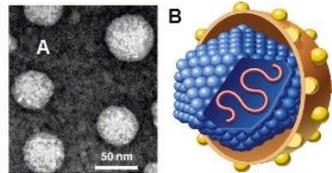


Figure 12 : (A) Observation microscopique de particules (Petit *et al.*, 2005) et (B) Structure schématique de la particule virale C. (James A. Perkins 2001)

La densité, dans le sérum, des particules virales analysées par ultracentrifugation en gradient de saccharose est variable, allant de 1,06 à 1,35 g/ml (Hijikata *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 2005). Cette variabilité reflète l'hétérogénéité des particules circulantes pouvant être des capsides virales non enveloppées ; des virions sous forme libre ou associés à des macromolécules, en particulier des β -lipoprotéines ou des immunoglobulines. Un pourcentage important de ces particules seraient des particules défectives.

3 - STRUCTURE DU GENOME

Le génome du VHC est constitué d'un ARN monocaténaire, de polarité positive, d'une taille de 9600 nucléotides environ. Les régions non codantes situées aux extrémités 5' et 3' du génome encadrent une phase de lecture majeure qui code pour une polyprotéine de 3000 acides aminés environ et une autre mineure obtenue par décalage du cadre de lecture et codant une protéine F encore mal décrite.

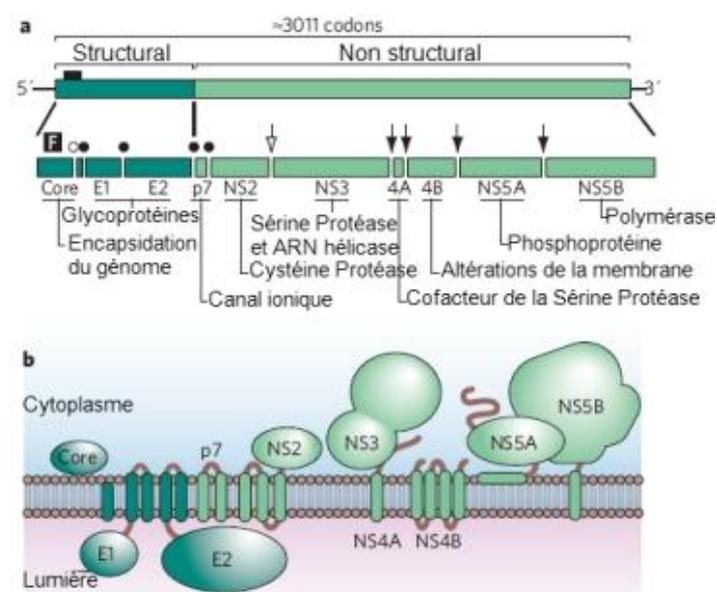


Figure 13 : Organisation du génome viral (a) et représentation du clivage de la polyprotéine (b). (Lindenbach et Rice, 2005)

La polyprotéine majeure schématisée dans la Figure 13.a est clivée sur plusieurs sites par des signal-peptidases cellulaires (●) ou la peptidase du peptide signal (○), par le complexe NS3-NS4A (▼) ou par clivage autocatalytique de NS2 – NS3 (▽). La Figure 13.b représente la polyprotéine une fois clivée sur la membrane du RE.

B - STRUCTURES ET FONCTIONS DES PROTEINES VIRALES

1 - PROTEINES STRUCTURALES

1.1 - CAPSIDE ET PROTEINE F

La protéine de capsid est le premier produit de clivage de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine au niveau de l'acide aminé 191 sous l'action de protéases cellulaires. Il s'agit d'une protéine fortement basique de 21kDa de taille avec des régions très hydrophobes. Des protéines de 19kDa générées par un clivage secondaire ont été décrites dans des modèles cellulaires. Elles sont localisées dans le réticulum endoplasmique (RE).

La protéine de capsid est la sous unité de base qui, par multimérisation, forme la **nucléocapside virale**. Elle fixe l'ARN viral et permet l'encapsidation du génome. Elle se fixe également aux glycoprotéines de l'enveloppe pour l'assemblage des virions (Figure 14).

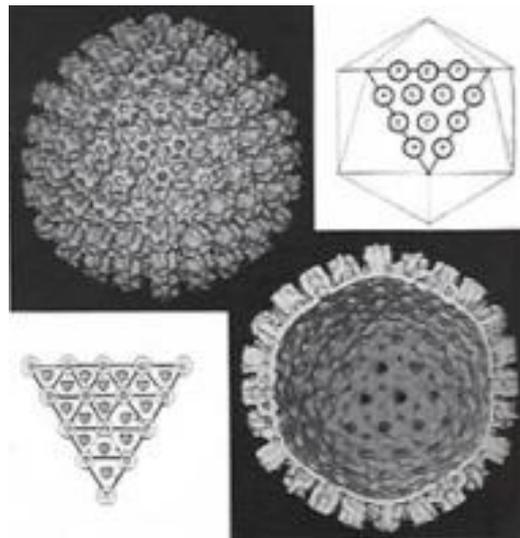


Figure 14 : Modélisation de la capsid du VHC. © epidemic.org

Son action ne se limite cependant pas à sa fonction « structurale ». De nombreuses autres propriétés ont été décrites, notamment de **régulation de la traduction** en s'associant aux ribosomes via les sous unités 60S, et de **modulation de nombreuses fonctions biologiques** (signalisation cellulaire, apoptose, carcinogénèse, métabolisme lipidique...). La réalité de ces fonctions reste à établir mais il semble de plus en plus certain que cette protéine joue un rôle primordial dans la pathogénicité du virus.

PROTEINE F

Récemment, a été identifiée la **protéine F** (*frameshift* - aussi appelée ARFP pour Alternative Reading Frame Protein) issue d'une phase de lecture alternative au niveau du gène de capsid. On sait aujourd'hui que cette protéine aurait un poids moléculaire de l'ordre de 17kDa. On ignore encore si elle est synthétisée par les cellules au cours de l'infection humaine et à quel niveau. On ne sait pas non plus quelle est sa localisation subcellulaire et sa fonction dans le cycle viral (Branch *et al.*, 2005).

1.2 - GLYCOPROTEINES D'ENVELOPPE E1 ET E2

Les glycoprotéines E1 (31 kDa) et E2 (70 kDa) sont les constituants majeurs de l'enveloppe du VHC. Elles résultent du clivage de la polyprotéine par des signal-peptidases comme illustré par la Figure 13. Les protéines E1 et E2 sont fortement glycosylées et sont capables de s'associer entre elles par leur domaine transmembranaire en deux types d'hétérodimères stables (respectivement avec ou sans pont disulfure), ce qui constitue une étape critique de la morphogénèse des virions comme illustré par la Figure 15.

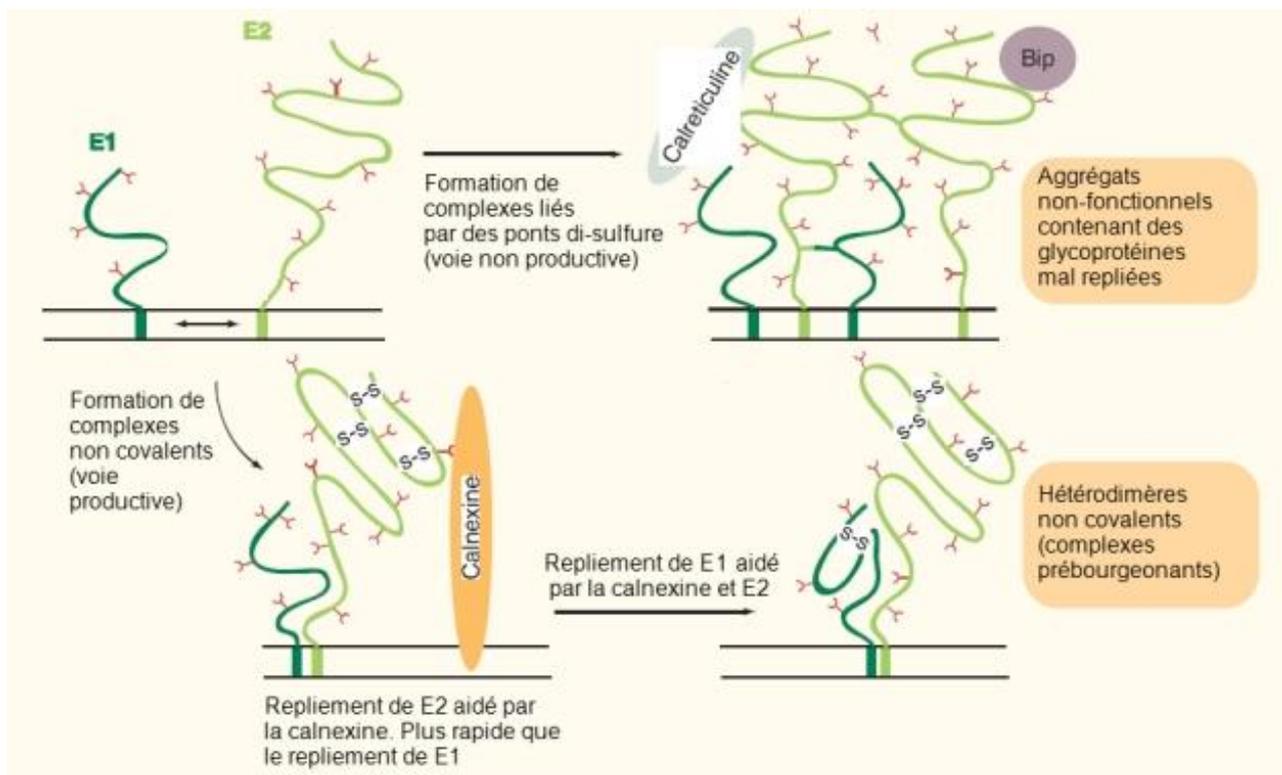


Figure 15 : Modèle hypothétique résumant le repliement et l'assemblage des glycoprotéines d'enveloppe du VHC. (Chapel *et al.*, 2006b)

Les protéines d'enveloppe E1 et E2 ont des fonctions **multiples et importantes** :

- Elles jouent un rôle important pour la **morphogénèse des virions infectieux**. Elles forment des hétérodimères non covalents dans le RE des cellules infectées qui seraient les complexes prébourgeonnants. On retrouve en effet ces complexes dans les particules virales. L'interaction entre la nucléocapside et le complexe prébourgeonnant n'a pas encore été étudié en détail, et on ne sait toujours pas quel est la force motrice du bourgeonnement viral (Op De Beeck *et al.*, 2001 ; Voisset et Dubuisson, 2004).
- Le complexe E1-E2 permettrait aussi l'interaction avec le ou les récepteurs viraux et donc **l'entrée du virus** dans les hépatocytes. Son interaction avec plusieurs récepteurs probables du VHC dont CB81 a bien été étudié (Flint *et al.*, 1999).
- Il a par ailleurs été montré qu'E2 pouvait **interférer avec la fonction de PKR**, une kinase induite par les ARN double-brin qui participe à la mise en place de la réponse interféron. Ainsi, E2 pourrait jouer un rôle important pour permettre un échappement du virus aux défenses de l'hôte (Pavio *et al.*, 2002).

Sur le plan antigénique, E1 et E2 ont été étudiés en termes de variation antigénique et de mécanisme de la persistance virale. E2 représente la partie la plus variable du génome du VHC. Cette variabilité participe à la sélection de variants d'échappement au système immunitaire. Une région hypervariable (34 acides aminés en N-terminal) nommée HVR-1 a été décrite au sein de la séquence d'E2. L'extrême variabilité de cet épitope rend difficile son utilisation dans une stratégie vaccinale.

1.3 - P7

La petite protéine P7 (7kDa) est une protéine membranaire intégrale composée de 2 segments hydrophobes traversant la membrane du RE et séparés par 3 résidus basiques exposés à la surface cytosolique de la membrane. Cette protéine capable de s'oligomériser pour former des canaux ioniques serait impliquée dans la morphogénèse et la sécrétion virale (Sakai *et al.*, 2003). Plusieurs arguments suggèrent que p7 n'est pas associée aux virions et ne

participerait pas à l'entrée du virus ; son rôle semble cependant essentiel dans le cycle viral et pourrait devenir une cible pour de futurs traitements (Pavlovic *et al.*, 2003 ; Sakai *et al.*, 2003).

2 - PROTEINES NON STRUCTURALES

2.1 - NS2

NS2 est une protéine hydrophobe de 23 kDa qui est associée à la membrane du RE dans les cellules infectées ; son rôle propre reste encore à étudier. Cette protéine forme, avec la partie N-terminale de la protéine NS3, une **métalloprotéase** zinc-dépendante responsable du clivage autocatalytique entre NS2 et NS3.

2.2 - NS3

La protéine NS3, une des protéines les plus étudiées du VHC, est une protéine hydrophile de 70 kDa dont le tiers N-terminal porte une activité **protéase** et les deux tiers C-terminaux, une activité **hélicase** et **NTPase**, ce qui lui confère une activité enzymatique complexe. L'activité sérine protéase de NS3 assure le clivage au niveau des jonctions NS3/4A (en cis), NS4A/B, NS4B/5A et NS5A/B (en trans). Le domaine responsable de l'activité sérine protéase est représenté en rose sur la Figure 16, son cofacteur NS4A en vert et le domaine responsable de l'activité hélicase en bleu. Les sites actifs des fonctions ARN hélicase et sérine protéase sont représentés en rouge (Lindenbach et Rice, 2005).

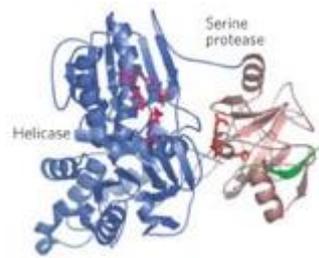


Figure 16 : Modélisation de NS3. (Lindenbach et Rice, 2005)

Ces trois fonctions (protéase, ARN hélicase et NTPase) portées par différents domaines de la protéine confèrent à NS3 un rôle majeur dans la **réplication** du virus (Tomei *et al.*, 1993). Il a également été décrit des interactions entre NS3 et la protéine kinase A (PKA). NS3 exercerait une régulation de la signalisation cellulaire AMPc dépendante via PKA et pourrait influencer la survie et la prolifération de la cellule (Borowski *et al.*, 1999).

2.3 - NS4A ET NS4B

La région NS4 est constituée de deux protéines hydrophobes, NS4A et NS4B.

NS4A est une petite protéine de 54 AA et de masse moléculaire de 8kDa qui aurait au moins trois fonctions : **l'activation de la fonction sérine protéase de NS3** (illustrée dans la Figure 16 ci-dessus), **l'ancrage de NS3** et d'autres protéines du complexe de réplication du VHC aux membranes cellulaires grâce à son domaine hydrophobe et **l'interaction avec la protéine NS5A** en régulant sa phosphorylation.

NS4B est une protéine plus longue (260 AA - 27kDa) qui participe au complexe de réplication. Elle s'associe avec la membrane du RE et forme une protéine transmembranaire intégrale orientée vers le cytoplasme. Elle est capable en particulier d'induire la formation d'un réseau membranaire qui pourrait être le site de réplication du VHC (Egger *et al.*, 2002).

Des études suggèrent que NS4A et NS5B pourraient inhiber la synthèse protéique cellulaire, favorisant ainsi la traduction des protéines virales ou diminuant le taux de certaines protéines cellulaires (Florese *et al.*, 2002).

2.4 - NS5A ET NS5B

La région NS5 comprend deux protéines majeures : NS5A et NS5B, produites après clivage de la polyprotéine par la sérine protéase NS3 associée à son cofacteur NS4A.

NS5A, protéine hydrophile associée aux membranes, existe sous deux isoformes de masse moléculaire de 56 et 58 kDa correspondant à des degrés différents de phosphorylation des résidus sérine, phosphorylations médiées par une kinase cellulaire non encore identifiée. Comme illustré par la Figure 17. NS5A contient trois domaines structuraux distincts. Le domaine I forme un dimère autour de 2 ions Zn^{2+} (en violet) qui pourrait interagir avec d'autres protéines sur la face externe (lignes noires) et se lier à l'ARN via le canal ionique central ainsi formé. L'existence de ponts disulfures internes (en rouge), un élément assez rare pour une protéine cytosolique laisse penser à une forme de régulation (Lindenbach et Rice, 2005).

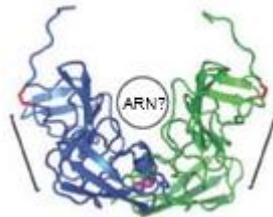


Figure 17 : Modélisation d'un dimère du domaine I de NS5A. (Lindenbach et Rice, 2005)

La fonction principale de NS5A demeure inconnue, même si plusieurs activités lui ont été associées. Elle pourrait participer à la **régulation de la transcription de gènes cellulaires** (Ghosh *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que NS5A pouvait **interagir avec le système IFN** et être impliqué dans les mécanismes de résistance du VHC à l'action antivirale de l'interféron (Enomoto *et al.*, 1995 ; Gale Jr *et al.*, 1997 ; SI et Katze, 2001).

NS5B est une protéine de masse moléculaire apparente de 68kDa, dont la séquence nucléotidique est extrêmement conservée, non seulement dans les différents isolats du VHC mais aussi chez les pestivirus, les flavivirus et d'autres virus à ARN. Elle possède en particulier un motif en AA caractéristique de toutes les ARN polymérases ARN dépendantes, GDD (en rouge dans la Figure 18). Elle serait donc **l'ARN polymérase du VHC**, son action s'exerçant au sein du complexe de réplication en interaction avec les autres protéines non structurales.

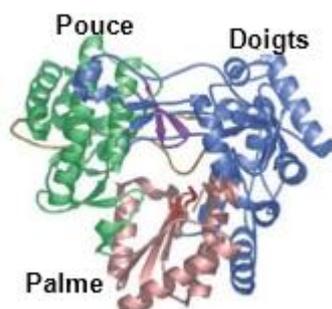


Figure 18 : Modélisation de NS5B dans un modèle « main droite » avec les doigts, le pouce et la palme. (Lindenbach et Rice, 2005)

C - REGIONS NON CODANTES

Les protéines structurales et non structurales du VHC sont traduites selon un mécanisme original en comparaison avec les mécanismes « classiques » de traduction des cellules procaryotes ou eucaryotes. Dans la région 5'UTR (région non traduite de l'extrémité 5'), on trouve un **IRES** (Site Interne d'entrée du Ribosome) responsable de l'initiation de la traduction. Une région également hautement structurée en 3'UTR intervient dans la réplication.

1 - 5'UTR : IRES

Avant de présenter la région IRES du VHC, j'ai choisi de rappeler quelques notions sur **la traduction** et les **IRES**.

1.1 - GENERALITES SUR LA TRADUCTION ET LES IRES

1.1.1 - RAPPELS SUR LA TRADUCTION

L'initiation classique de la traduction chez les eucaryotes débute par la reconnaissance de la « coiffe » en 5' du messager (une 7- méthyl guanosine fixée au premier nucléotide par un pont triphosphate) par le facteur d'initiation 4E de la traduction (eIF4E). Il y a ensuite assemblage des autres facteurs d'initiation, de la sous unité 40S du ribosome et balayage de la région 5'UTR jusqu'au codon AUG initiateur (Figure 19)

Bien que le « coiffage » des messagers ne soit pas indispensable, ce modèle est largement admis pour la traduction des ARN eucaryotiques et de certains virus. Il permet une synthèse protéique soutenue et un contrôle de l'activité du complexe eIF4E/eIF4G par phosphorylation. Des protéines peuvent réguler la fixation de la sous unité 40S (IRP1/2) (Sachs *et al.*, 1997).

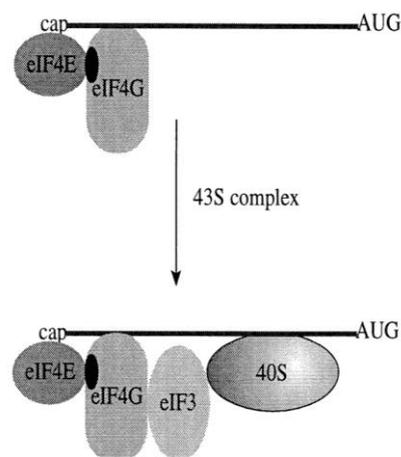


Figure 19 : Initiation de la traduction des ARN « coiffés ». (Sachs *et al.*, 1997)

La traduction coiffe-dépendante n'est cependant pas la seule possibilité. Une traduction IRES dépendante existe chez de nombreux virus et dans certains gènes eucaryotes.

1.1.1.a - IRES VIRAUX

Beaucoup de virus à ARN dont le poliovirus, les rhinovirus ou les *flaviviridae* comme le VHC synthétisent leurs protéines de manière coiffe-indépendante dans les cellules infectées. L'efficacité de la traduction dépend d'une région hautement structurée située dans la partie 5'UTR connue sous le nom d'IRES (Jang *et al.*, 1988; Pelletier et Sonenberg, 1988). Toutes ces régions 5'UTR ont des tailles proches (600-1200nt) et la partie IRES occupe ~ 450nt (Jackson *et al.*, 1996).

Bien qu'il n'y ait que peu d'homologie de séquences entre ces différents IRES, des similarités apparaissent au niveau de la structure (Jia *et al.*, 1996). La séquence nucléotidique semble avoir une importance prioritaire dans le maintien

de régions structurées en tiges ou en boucles (Honda *et al.*, 1999). Cela suggère un rôle important dans la traduction (Poyry *et al.*, 1992). Des mutants ponctuels de l'IRES ont été identifiés. Ils s'accompagnent en général d'une mutation additionnelle qui permet de retrouver l'appariement des bases et ainsi le maintien de la structure secondaire (Haller et Semler, 1992 ; Hoffman et Palmenberg, 1996).

Le mécanisme d'initiation de la traduction est donc différent de celui observé dans la majorité des ARNs. On pense que les facteurs cellulaires agissant en *trans* sur l'IRES (ITAFs) viennent se localiser directement à proximité du codon initiateur AUG du fait de la structure particulière de l'ARN à ce niveau, sans balayage « classique » par le ribosome de la région 5'UTR (Wang *et al.*, 1993). (Figure 20). Des travaux récents sur le VIH montrent que l'utilisation d'un IRES constituerait un avantage au virus en lui permettant de s'affranchir de la machinerie de traduction cellulaire, hors ribosomes bien sûr (Brasey *et al.*, 2003).

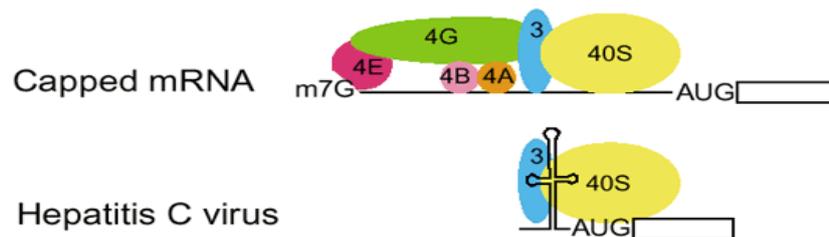


Figure 20 : Comparaison entre une initiation de traduction interne et cap dépendante

1.1.1.b - IRES DANS DES GENES EUKARYOTES

Bien que la majorité des ARNm eucaryotiques soient coiffés, un petit nombre de transcrits contiennent un IRES, en général localisé dans la région 5' UTR, qui permet une initiation coiffe-indépendante de la traduction. Ces ARNm sont soumis à la plupart des mécanismes régulateurs qui contrôlent le recrutement des ARNm dans le complexe de traduction. En 2001 on recensait près de 30 gènes cellulaires avec un IRES (Hellen et Sarnow, 2001). Un site Internet recense les IRES dans le monde vivant (Bonnal *et al.*, 2003).

Au niveau structurel, les IRES cellulaires semblent être composés de plusieurs séquences non contiguës qui exercent une activité IRES intrinsèque. C'est le cas pour la protéine Bip (Yang et Sarnow, 1997), pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Huez *et al.*, 1998) ou pour c-myc (Stoneley *et al.*, 1998). Les hypothèses divergent quant aux rôles de ces « sous unités » et leurs caractéristiques. Il est probable qu'il y ait dissociation de l'IRES en plusieurs sous unités avec des rôles propres à chacune, ce que l'on ne retrouve pas chez les virus, probablement pour des raisons évolutives de condensation de l'information génétique. Il est établi de manière certaine que des facteurs cellulaires régulent ces éléments comme eIF4G qui stimule la traduction (Hayashi *et al.*, 2000). De nombreux autres ITAFs ont été identifiés et pourraient expliquer la régulation traductionnelle des ARNm avec des IRES au cours du cycle cellulaire, dans des situations de stress ou encore la spécificité cellulaire. En effet une particularité des éléments IRES cellulaires est d'avoir une activité fortement dépendante du type cellulaire et du stade de développement (Creancier *et al.*, 2000 ; Stoneley *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 1997). Ces auteurs pensent qu'il existe un lien avec la disponibilité en ITAFs spécifiques à un stade du cycle cellulaire et dans un type cellulaire donné.

1.2 - STRUCTURE ET DE LA REGION 5'UTR DU VHC ET MECANISME DE TRADUCTION

1.2.1 - STRUCTURE

La région 5' UTR du VHC contient les séquences les plus conservées du génome. Son haut degré de conservation en fait une région de choix pour la sélection d'amorces utilisées lors de la transcription inverse et de l'amplification de l'ARN du VHC par PCR permettant une excellente sensibilité de la technique en conditions diagnostiques.

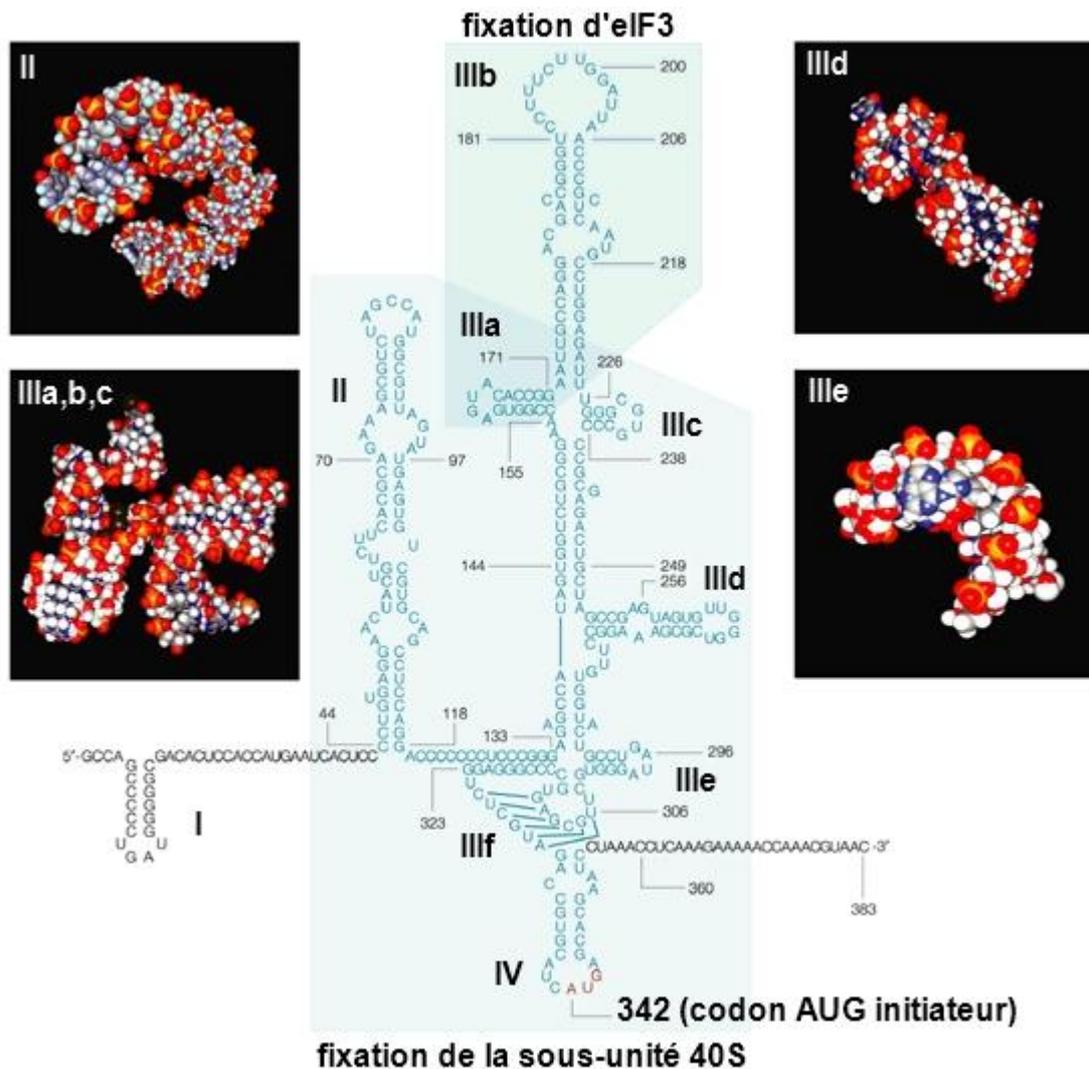


Figure 21 : Séquence et structure de l'IRES du VHC. (Tan *et al.*, 2002)

La région 5' non codante présente, de 5' en 3' (Figure 21)

- un repli en épingle à cheveux à l'extrémité 5', de 27 nucléotides, qui pourrait jouer un rôle de régulation négative de la traduction des protéines virales.
- trois à cinq petits cadres de lecture ouverts (selon les génotypes) non traduits, qui pourraient représenter des reliquats du virus ancêtre.
- une structure complexe impliquée dans l'initiation de la traduction du cadre de lecture ouvert unique du VHC (Han *et al.*, 1991).

La région 5' non codante comprend quatre structures « tige-boucle » principales (I à IV) et un pseudo-nœud qui contribuent à sa structure secondaire complexe. L'IRES occupe pratiquement toute la longueur de cette région (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992).

Les contraintes de conservation de la structure secondaire tige-boucle sont probablement responsables de la grande conservation de la séquence de la région 5' UTR.

1.2.2 - MECANISME DE LA TRADUCTION

Les structures tige-boucle semblent interagir directement avec des protéines virales et/ou cellulaires au cours de la réplication et de la traduction des virus à ARN. Ainsi, trois protéines, nommées **PTB** (polypyrimidine tract-binding

proteins) interagissent avec la région 5' UTR et il a été montré que des facteurs associés aux PTB sont nécessaires à une initiation efficace de la traduction (Ali et Siddiqui, 1995 ; Hellen *et al.*, 1993 ; Niepmann *et al.*, 1997). Beaucoup d'autres protéines cellulaires interagissant physiquement avec l'IRES ont été identifiées. Parmi elles on trouve l'**autoantigène La** (Ali et Siddiqui, 1997; Meerovitch *et al.*, 1993), **poly r(C) binding protein2 (PCBP2)** (Blyn *et al.*, 1996 ; Gamarnik et Andino, 1997) et la **glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)** (Schultz *et al.*, 1996). Les protéines La, PTB et PCBP-2 stimulent la traduction IRES dépendante dans des extraits cellulaires déplétés en ces protéines (Blyn *et al.*, 1997; Kaminski *et al.*, 1995 ; Svitkin *et al.*, 1994). Ces protéines cellulaires semblent ainsi se lier à l'IRES et faciliter la liaison des ribosomes à la structure (Figure 22).

Il a également été montré qu'**eIF3** se fixait spécifiquement sur l'IRES du VHC ; il joue un rôle essentiel dans le processus d'initiation de la traduction, par reconnaissance directe et spécifique de la sous-unité 40S du ribosome et d'eIF3 par la structure tertiaire de l'IRES. Les sites de fixation de eIF3 sur l'IRES sont situés principalement sur la structure cruciforme du domaine III, englobant les sous-domaines IIIa, IIIb et IIIc (Sizova *et al.*, 1998).

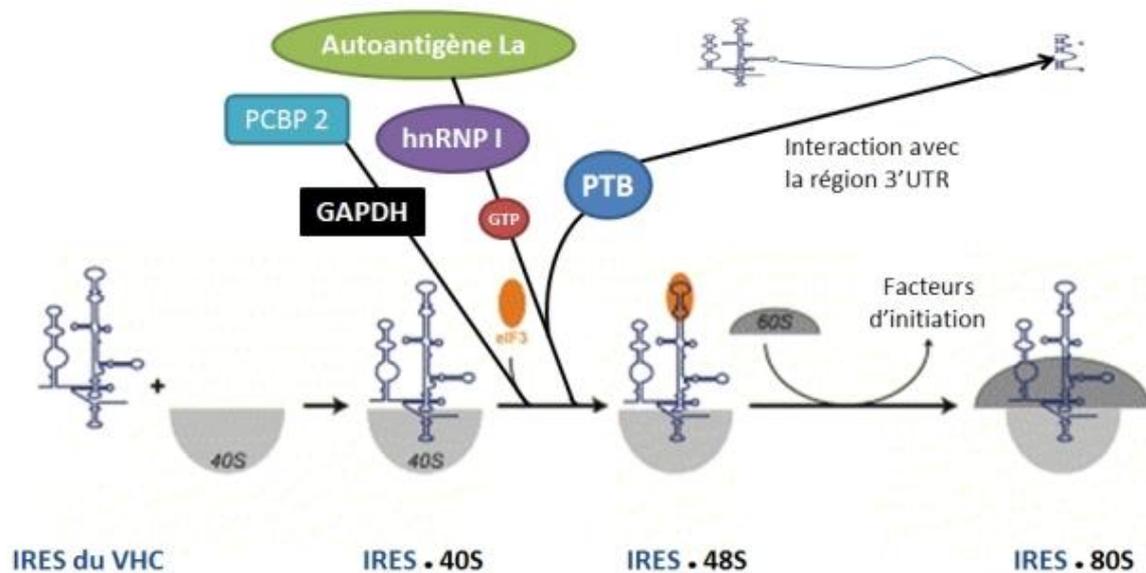


Figure 22 : Modèle de l'initiation de la traduction du VHC. Adapté de (Otto et Puglisi, 2004)

La traduction de la polyprotéine est initiée par le codon situé au nucléotide 342. Les séquences entourant ce codon maintiennent un état très structuré, notamment le pseudo-noeud. Il semble que le maintien de cet état soit crucial pour la fonctionnalité de l'IRES. Des changements des structures primaires, secondaires et tertiaires de l'IRES affectent en effet la liaison des protéines cellulaires, induisant une diminution de l'efficacité de la traduction (Wang *et al.*, 1994; Yen *et al.*, 1995).

Il a été enfin rapporté que des mutations réduisant la stabilité de la tige-boucle IV ne réduisaient pas l'efficacité de la traduction. Des mutations stabilisant cette tige-boucle provoqueraient au contraire une diminution significative de l'activité IRES (Honda *et al.*, 1996). L'efficacité de la traduction serait donc inversement dépendante de la stabilité de la boucle IV. Une faible stabilité de la boucle IV permettrait en fait la dissociation en ARN monocaténaire, la fixation de la sous-unité ribosomale 40S et l'initiation de la traduction (Lemon, 1997).

Des travaux récents ont enfin démontré que **la région 3'UTR augmentait fortement la traduction IRES dépendante du VHC** par interaction entre les boucles structurées des deux régions (Song *et al.*, 2006).

2 - 3'UTR

L'extrémité 3' du génome est également une région hautement structurée; elle comporte trois régions successives, de 5' en 3' : une **région variable** de 30 nucléotides; une **région poly-U/C** de longueur variable et une **région 3'**

terminale très conservée de 98 nucléotides, la région X, repliée en trois tiges-boucles successives (Figure 23). Cette région joue un rôle important dans l'initiation de la synthèse du brin négatif d'ARN au cours de la réplication et fixe une protéine PTB (polypyrimidine tract-binding protein), permettant comme mentionné plus haut d'initier la traduction via une interaction avec la région IRES (Yanagi *et al.*, 1999).

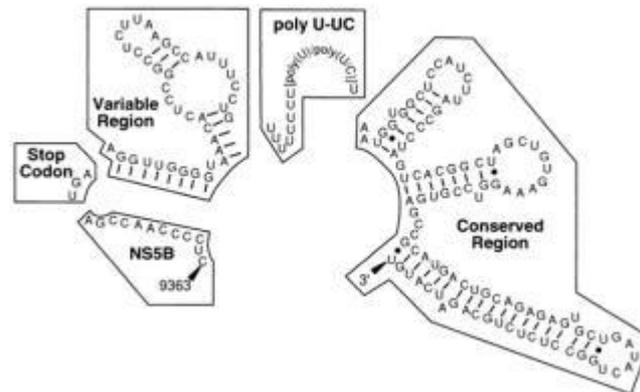


Figure 23 : Représentation schématique de la région 3' non codante du VHC. (Yanagi *et al.*, 1999)

D - CYCLE VIRAL

Les mécanismes de réplication du VHC sont encore imparfaitement connus du fait de l'absence jusqu'à récemment d'un système de culture cellulaire ou d'un véritable modèle animal. Ces deux freins étant aujourd'hui levés, des avancées significatives sont à attendre d'ici peu de temps. La compréhension actuelle des mécanismes moléculaires de la réplication repose essentiellement sur des analogies avec les virus de la même famille, sur des données obtenues avec le modèle réplicon et sur la caractérisation de protéines recombinantes du VHC

1 - TROPISME

Le VHC est un virus principalement hépatotrope mais plusieurs études ont montré que des séquences d'ARN du VHC pouvaient être détectées par PCR dans des cellules mononuclées du sang périphérique (lymphocytes B, T et cellules monocytaires). Ces observations permettent de penser qu'il existerait des réservoirs secondaires du VHC qui seraient responsables des manifestations extra-hépatiques, à l'origine de variants et surtout de la persistance virale notamment observée lors des réinfections de foies greffés après transplantation (Lerat *et al.*, 1998). Des IRES avec des séquences lymphoïdes ont notamment été identifiées et semblent confirmer cette hypothèse (Lerat *et al.*, 2000).

2 - ENTREE DANS LA CELLULE

L'étape initiale du cycle de l'infection virale est la fixation du virus à la cellule cible, étape qui nécessite une interaction entre une (des) protéine(s) virale(s) et un **(des) récepteur(s) spécifique(s)**. Le ou les récepteurs du VHC n'ont pas été identifiés de façon formelle à ce jour, même si plusieurs candidats ont été décrits. Récemment, des modèles basés sur une **entrée pH dépendante** ont vu le jour.

2.1 - RECEPTEURS

Plusieurs candidats récepteurs ont été décrits, incluant la tétraspanine **CD81**, le récepteur « scavenger » de classe B type I (**SR-BI**), le récepteur des lipoprotéines de faible densité (**rLDL**), le récepteur aux asialoglycoprotéines (**rASGP**) les glycosaminoglycane ainsi que les molécules **DC-SIGN** (dendritic cell-signaling ICAM-3 grabbing nonintegrin) et **L-SIGN** (Liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin). La liste est cependant loin d'être exhaustive. En effet, jusqu'à récemment, l'absence de modèle pertinent de réplication *in vitro* rendait les études difficiles et sujettes à caution, en particulier du fait des conditions non physiologiques utilisées.

Les données les plus récentes obtenues avec le système de réplication complet du VHC semblent renforcer le rôle de **CD81** et **SRB1** (Kapadia *et al.*, 2007). Il demeure que l'entrée du VHC implique probablement plusieurs de ces protéines et soit un processus complexe.

2.2 - ENTREE PH DEPENDANTE

Les virus de la famille des *Flaviviridae*, en particulier les *flavivirus*, pénètrent dans la cellule par endocytose puis **fusion des membranes virale et cellulaire à pH acide** (Heinz *et al.*, 1994). Plusieurs études suggèrent que le VHC utilise ce même mode d'entrée.

Le modèle des pseudos-particules virales (VHCpp - voir p. 57) a confirmé que l'entrée du VHC dans les cellules cibles devait être *pH dépendante* (Bartosch *et al.*, 2003c; Lin *et al.*, 2004a; Op De Beeck *et al.*, 2001). Dans le système de réplication complet du VHC, le pré-traitement des cellules cibles avec deux drogues connues pour interférer avec l'acidification des endosomes (bafilomycine A1 et chloroquine) a conduit à l'inhibition de l'entrée virale (Blanchard *et al.*, 2006). Récemment, le seuil de pH permettant la fusion des VHCpp avec des liposomes a été estimé à 6,3, avec un pH optimum à 5,5 (Kobayashi *et al.*, 2006; Lavillette *et al.*, 2006).

Une fois cette étape de fusion achevée, le génome viral est probablement libéré dans le cytoplasme par décapsidation et l'expression des gènes viraux peut commencer.

3 - MODELE DU CYCLE VIRAL

Si on se base sur un cycle cellulaire « idéal » représenté par la Figure 24, la particule virale enveloppée des protéines de surface E1 et E2 **interagit avec des récepteurs membranaires** spécifiques. La **fusion** entre les membranes cellulaires et virales, probablement déclenché par une baisse de pH après que le virus se soit fixé *via* E1 et E2 sur un/des récepteurs. La particule est **décapsidée** et **l'ARN est traduit**, probablement par des ribosomes associés au RE (voir p. 41). Après **maturation des protéines**, la **réplication** de l'ARN peut avoir lieu. Le processus de réplication est similaire à celui observé chez les flavivirus avec synthèse d'un ARN négatif qui sert de matrice puis de la réplication à proprement parlé de l'ARN (voir détails sur la page suivante). Le **virion est ensuite assemblé** au niveau du RE et les particules virales vont transiter par le Golgi, subissant des **modifications** au niveau des protéines de surface (voir p. 35). Les nouveaux virions sont au final libérés, **sans lyse cellulaire**, à la différence d'autres virus qui sont cytopathiques.

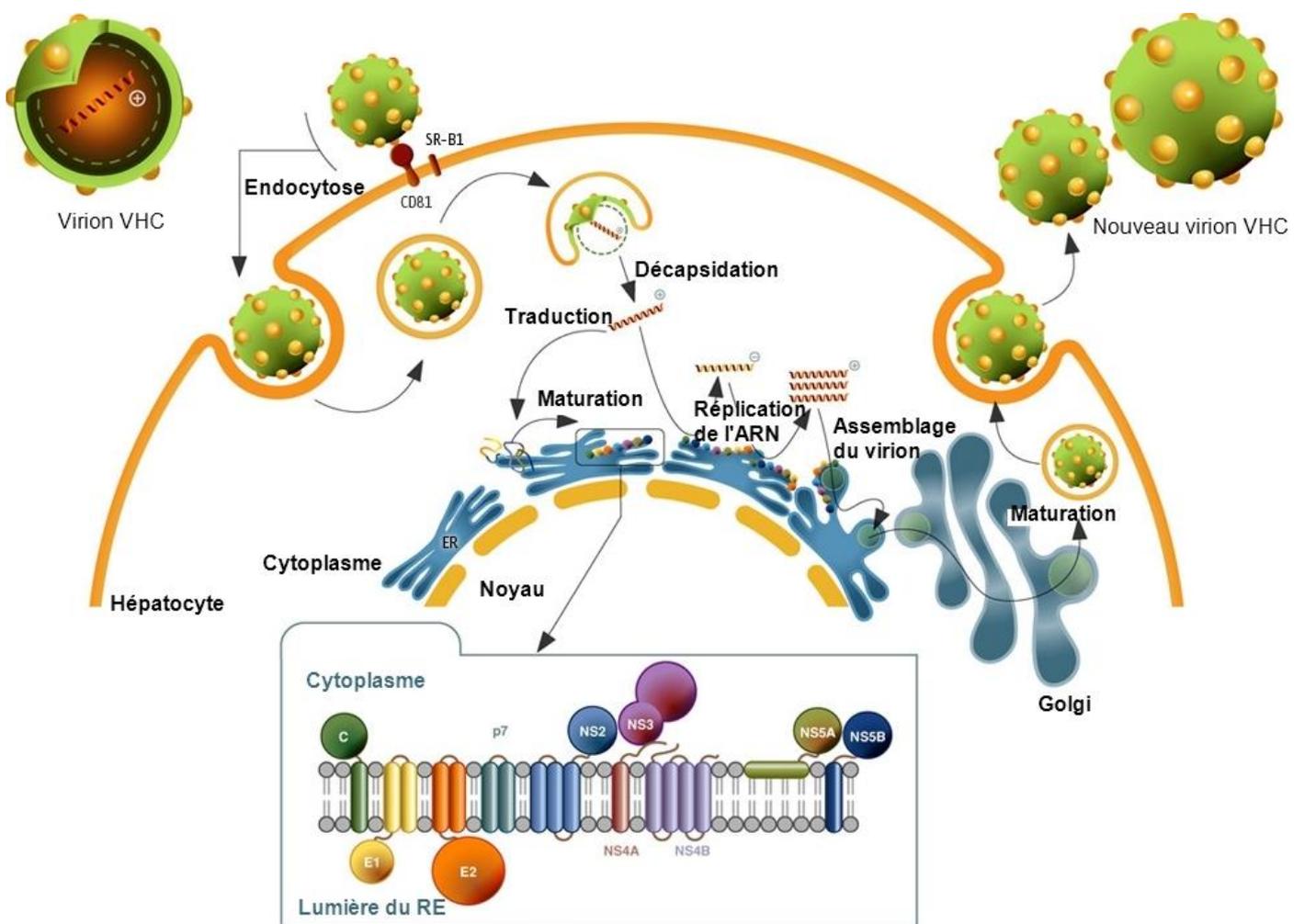


Figure 24 : Cycle cellulaire du VHC. ©Tibotec.com

E - VARIABILITE GENETIQUE

La variabilité génétique est une caractéristique commune aux virus dont le génome est un ARN ou qui utilisent un intermédiaire ARN au cours de leur réplication. Elle résulte du manque de fidélité des ARN polymérases virales, enzymes responsables de la réplication. La variabilité génétique des virus à ARN a des conséquences importantes dans la pathogénicité de l'infection et des maladies associées. Elle a été à l'origine de l'émergence et de la diversification ultérieure des génotypes viraux au cours de l'évolution. Elle est également responsable de la distribution en quasiespèces du virus.

1 - REPLICATION ET VARIABILITE GENETIQUE DU VHC

La réplication du VHC est assurée par un ARN polymérase dépendante de l'ARN, protéine virale de 68kDa codée par la région située à l'extrémité 3' du cadre de lecture ouvert (Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997). La polymérase catalyse la **synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative**, complémentaire de l'ARN génomique, qui sert de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN de polarité positive. Ces derniers sont encapsidés et enveloppés au sein de particules virales néoformées ou servent d'ARN messagers pour la synthèse intracytoplasmique des protéines virales (Figure 25).

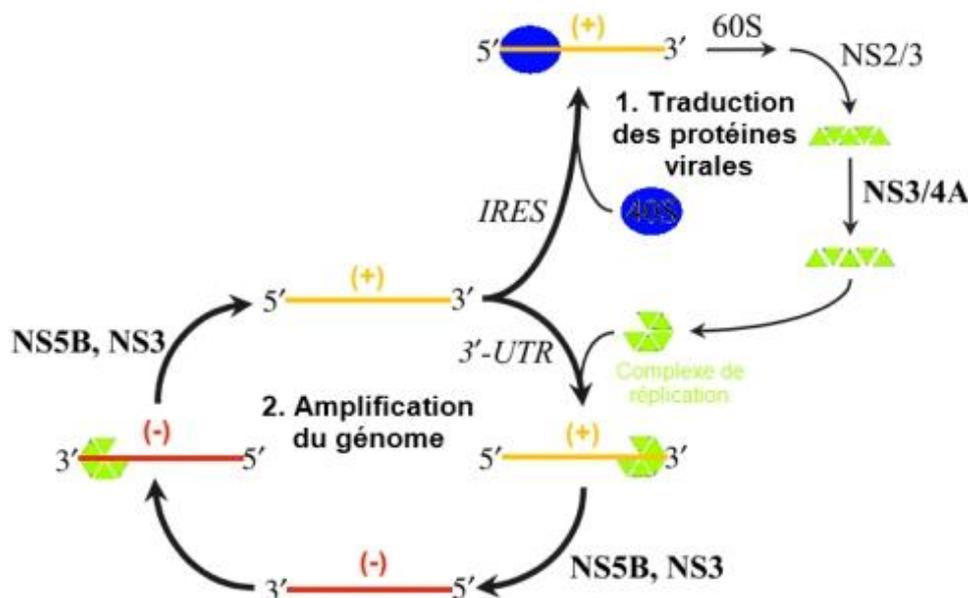


Figure 25 : Schéma de la réplication du VHC.

La diversification permanente des populations virales conduit à leur compétition et à la sélection continue des variants viraux les mieux adaptés à leur environnement répliatif. Ce phénomène est favorisé par **l'abondante production virale**, de l'ordre de 10^{12} virions par jour en moyenne, au cours de l'infection humaine (Neumann, 1998) et par le **taux élevé de mutations**, au cours de la réplication, lié au manque de fidélité de l'ARN polymérase (Domingo, 1998; Duarte *et al.*, 1994). Le taux d'erreur de l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC est en effet de l'ordre de 10^{-4} 10^{-5} par nucléotide copié. Chaque nouvel ARN synthétisé contient donc en moyenne une substitution nucléotidique par rapport à sa séquence mère (Domingo *et al.*, 2006). Ces erreurs ne sont pas corrigées par l'ARN polymérase virale car celle-ci est dénuée d'activité 3'-5' exonucléase correctrice (activité de *proofreading*). Les substitutions s'accumulent donc dans le génome au cours des cycles de réplication successifs. La majorité des séquences virales synthétisées au cours de la réplication sont défectives (c'est-à-dire qu'elles ne peuvent conduire à la production de virions infectieux), car la plupart des mutations survenant au hasard sont létales. Les mutations non létales sont quant à elles transmises à la descendance et s'accumulent au fil des générations. Elles peuvent conférer aux variants correspondants des avantages ou des désavantages sélectifs selon l'environnement au sein duquel le

virus se réplique (Domingo, 1998; Domingo *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 1994). On parle alors de « *genetic bottleneck* », un phénomène bien connu pour chez les virus à ARN.

La production et la sélection permanente de nouveaux variants viraux ont trois conséquences importantes : l'émergence, dans des zones géographiques ou dans des populations de malades particulières, des **génotypes du VHC** et leur diversification intervenue au cours de l'évolution et qui se poursuit, l'existence d'une **distribution en quasiespèces** de populations virales chez chaque individu infecté et au final des **implications cliniques**.

2 - ÉMERGENCE ET DIVERSIFICATION DES GENOTYPES DU VHC

L'analyse phylogénétique de séquences partielles ou complètes de souches virales isolées dans les cinq continents a permis d'identifier 6 groupes principaux, appelés « types », numérotés de 1 à 6 et plus d'une centaine de « sous-types », identifiés au sein de chaque type par une lettre minuscule : 1a, 1b, 1c, etc. (Robertson, 1998). Le terme « génotype » désigne indifféremment l'ensemble des types et sous-types. Les types diffèrent les uns des autres par 31 à 34 % de leur séquence nucléotidique et environ 30% de leur séquence amino-acidique. Les sous-types diffèrent les uns des autres par 20 à 23% de leur séquence nucléotidique avec des différences importantes selon la région du génome considéré (Robertson, 1998). Des niveaux de divergence intermédiaires entre type et sous-type ont été observés chez des variants viraux isolés principalement en Asie du Sud-Est. Ces derniers ont été initialement appelés types 7 à 11 (Tokita *et al.*, 1994). Ils sont aujourd'hui inclus dans le type qui leur est le plus proche, c'est à dire le 6 sauf le génotype 10a inclus dans le type 3 (Figure 26).

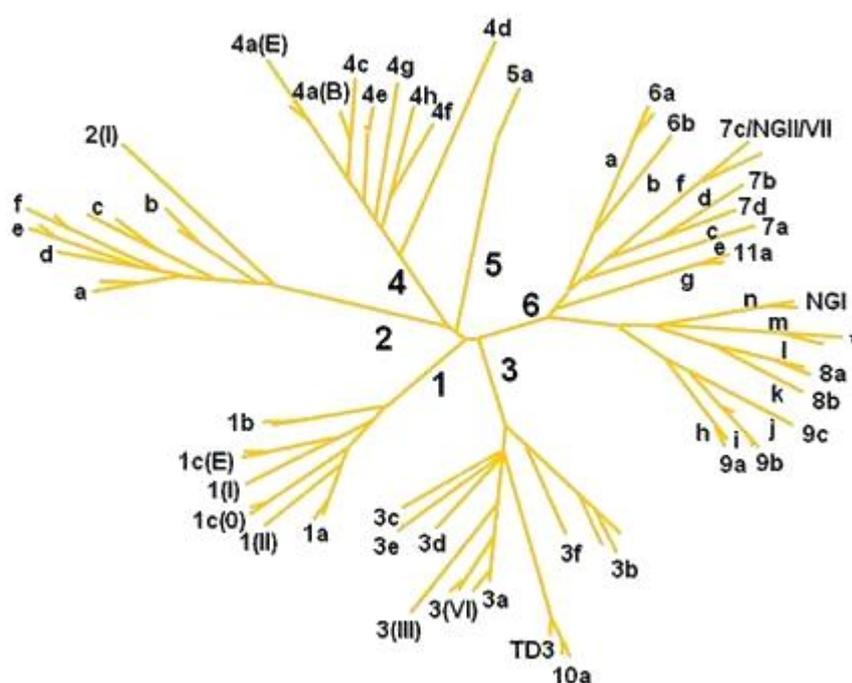


Figure 26 : Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques d'une partie de NS5B chez des individus infectés provenant des 5 continents. (Fang *et al.*, 1997)

L'étude génétique et phylogénétique des génotypes du VHC permet de mieux comprendre les mécanismes ayant conduit à leur émergence et à leur diversification, ainsi que les voies empruntées par l'épidémie mondiale d'hépatite C (Simmonds, 2004b). Ainsi, l'origine des *flaviviridae* infectant les primates pourrait remonter à la diversification des espèces de primates il y a environ 35 millions d'années. Le VHC aurait alors co-évolué avec les populations humaines lors de leur migration hors d'Afrique, il y a 100 000 à 150 000 années. Les génotypes actuels seraient apparus beaucoup plus récemment (Simmonds, 1999), il y a 700 ans pour le type 6, 350 ans pour le génotype 4 et 100 ans pour les autres (Pybus *et al.*, 2001). La grande diversité des génotypes en Asie ou en Afrique suggère une apparition très ancienne de ceux-ci. A l'opposé, la diversification des génotypes retrouvés en Europe, en Amérique ou au Japon

est bien plus faible, suggérant une apparition récente suivie d'une diffusion rapide. Schématiquement, le génotype 1b a été diffusé par les produits sanguins, le 1a par la toxicomanie par voie intraveineuse et le 3 par cette même voie mais seulement à partir des années 1960 (Pawlotsky *et al.*, 1995). Cela se confirme par exemple avec le ralentissement de la propagation du génotype 1b à relier avec la quasi disparition du risque transfusionnel.



Figure 27 : Distribution génotypique du VHC. (Fang *et al.*, 1997)

3 - DISTRIBUTION EN QUASIESPECES DES GENOMES

Chez tout malade infecté, le VHC circule sous la forme d'un mélange complexe et en équilibre instable de variants viraux génétiquement distincts bien qu'apparentés, appelé quasispèce (Martell *et al.*, 1992; Weiner, 2001). La distribution en quasispèces du VHC lui confère un avantage significatif en terme de survie, car la coexistence de multiples variants génomiques et la rapidité avec laquelle de nouveaux variants sont engendrés permettent la sélection rapide et continue des variants viraux les mieux adaptés à l'environnement répliquatif (Domingo *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 1994). Les forces sélectives antagonistes assurant cette sélection sont :

- les **contraintes conservatoires** sur la structure de l'ARN et/ou des protéines virales, liées à la nécessité de conserver leur fonctionnalité, indispensable à la survie des virions.
- des **pressions évolutives**, principalement liées aux réponses immunes humorales et cellulaires de l'hôte (Nagasaka *et al.*, 1996).

Les modifications de l'environnement dans lequel le VHC se réplique sont fréquentes au cours de l'infection. Elles peuvent être spontanées, liées à des interactions métaboliques complexes chez l'hôte ou déclenchées par des facteurs extérieurs, tels que des infections intercurrentes, une prise médicamenteuse ou un traitement antiviral.

4 - IMPLICATIONS CLINIQUES

Au niveau clinique, cette distribution en génotypes du VHC a des conséquences variables.

Au niveau du **pronostic de l'évolution** vers la chronicité ou des lésions hépatiques, le génotype n'a pas d'impact. Seul le génotype 3 est directement impliqué dans l'apparition de stéatose hépatocytaire (Adinolfi *et al.*, 2000; Rubbia-Brandt *et al.*, 2000).

La **réponse virologique** aux traitements (c'est-à-dire la capacité du traitement à éradiquer l'infection) est par contre très dépendante du génotype. Cela sera détaillé p. 73, mais en résumé il est admis que les taux de réponses sont plus faibles pour les génotypes 1 et 4 que pour les génotypes 2 et 3 (Toniutto *et al.*, 2006).

Enfin cette variabilité pose des problèmes pour le **développement d'un vaccin**, thérapeutique ou prophylactiques. En effet les épitopes potentiellement neutralisants sont aussi les régions les plus variables. Cette question sera débattue à partir de la page 83.

F - MODELES D'ETUDES

Les études fondamentales sur le VHC et le développement de composés antiviraux ont été longtemps limités par l'absence de systèmes d'infection *in vitro* satisfaisant. Lorsque la totalité du génome du VHC a été connue, la synthèse de clones d'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN viral a été réalisée par transcription inverse. Les ARN transcrits à partir de ces clones d'ADNc se sont révélés infectieux après injection intra-hépatique au chimpanzé (Kolykhalov, 1997) mais incapables de réplication en cultures cellulaires.

Ce n'est qu'en 1999 avec le système des réplicons sous-génomiques que la réplication du VHC à des taux élevés est devenue possible, sans toutefois qu'un cycle complet de réplication ne soit possible (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999). Ce n'est enfin que très récemment qu'un isolat de génotype 2a a permis la production de virus infectieux à des taux élevés en culture cellulaire (Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). En parallèle des systèmes plus ciblés sur l'étude d'une partie du virus se sont développés comme le système des pseudo-particules pour l'étude des protéines d'enveloppe (Bartosch *et al.*, 2003b) ou des systèmes d'expression bicistroniques pour l'étude des régions UTR (Collier *et al.*, 1998).

1 - MODELES ANIMAUX

1.1 - LE CHIMPANZE

L'homologie génétique entre le chimpanzé et l'homme est de plus de 98,5%. Le **chimpanzé** est le seul animal qui peut être infecté par le VHC de façon reproductible et qui présente une infection chronique. L'infection expérimentale de chimpanzés a été réalisée à partir du sérum de patients infectés et à partir d'ARN transcrits du VHC (Kolykhalov, 1997 ; Yanagi *et al.*, 1997). Cependant, on observe souvent chez cet animal une moindre sévérité de la maladie hépatique et des réponses immunes atténuées. L'utilisation du modèle chimpanzé est limitée pour des raisons évidentes d'éthiques, le chimpanzé étant une espèce protégée, ainsi que par son coût et les difficultés de maintien de ces animaux en laboratoire.

1.2 - LES PETITS ANIMAUX

Beaucoup d'études se sont concentrées sur la mise au point d'un modèle animal adapté à l'environnement du laboratoire. Des résultats intéressants ont été obtenus avec des modèles de souris transgéniques, humanisées ou encore avec les tupaïas.

LES TUPAÏAS

Ces petits mammifères non rongeurs ressemblant à des écureuils, peuvent être infectés *in vivo* par le VHC (Figure 28). Ce modèle n'est cependant pas idéal puisque ces animaux ne développent que des virémies transitoires ou intermittentes avec des titres très faibles, inférieurs à $3,5 \cdot 10^5$ copies/ml, à comparer aux 10^7 - 10^9 copies/ml que l'on trouve chez les patients atteints d'hépatite C chronique (Xie *et al.*, 1998).



Figure 28 : Dessin d'un Tupaïa. © tolweb.org - Joseph Smit

SOURIS CHIMERIQUES

Il s'agit de souris transgéniques pour un ou plusieurs gènes du VHC. Les principales études se sont focalisées sur l'expression de la protéine de capsid afin d'étudier son effet sur le métabolisme de l'hôte. Il a ainsi pu être montré qu'elle était responsable de lésions de l'ADN mitochondrial, reflétant ainsi l'augmentation de radicaux libres, ce qui pourrait expliquer les lésions de l'ADN des hépatocytes et à terme le développement du CHC (Okuda *et al.*, 2002). Ce modèle reste cependant limité car aucune souris transgénique n'a été capable de répliquer le génome viral.

SOURIS HUMANISEES

Ce dernier modèle mis au point utilise des souris SCID qui sur-expriment un transgène activateur du plasminogène sous le contrôle du promoteur de l'albumine (*Alb-uPA*). Ce transgène conduit à une surexpression d'urokinase dans le foie dès que le promoteur devient actif (à la naissance), responsable de la mort des hépatocytes et donc d'une atrophie hépatocytaire. Les souris sont alors transplantées par des cellules hépatocytaires humaines qui repeuplent le foie des souris. Une amélioration récente du système a permis d'obtenir des animaux totalement homozygotes, constituant un excellent modèle de part ses caractéristiques morphologiques et biochimiques proches d'un véritable foie humain (Meuleman, 2006).

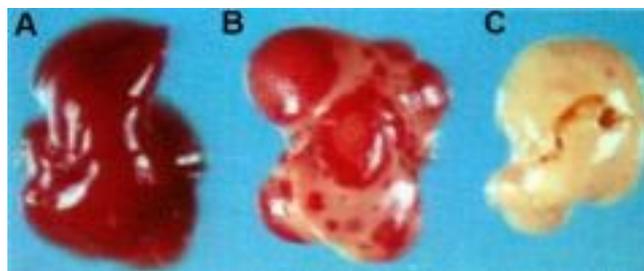


Figure 29 : Foie de souris (A) normal, (B) uPA +/- et (C) uPA +/-+. (Meuleman, 2006)

L'inoculation de sérum humain contenant du VHC a permis d'établir une infection persistante chez ces souris avec production de particules virales infectieuses (Mercer, 2001).

2 - VIRUS MODELES APPARENTES AU VHC

L'absence d'un système cellulaire permettant une réplication complète du VHC a été pendant longtemps un obstacle pour l'étude de la biologie et du cycle cellulaire du virus. Jusqu'à l'obtention en 2005 d'un tel système, encore imparfait, une approche a consisté à travailler sur des virus apparentés au VHC, appartenant à la famille des *flaviviridae*. De part leurs homologies de structure et de fonction, le **poliovirus**, le **virus de la diarrhée bovine (BVDV)** et le virus du **GBV-B** ont été très utilisés.

2.1 - GB VIRUS -B (GBV-B)

Le GBV-B est le virus le plus proche du VHC au niveau **génétique** (Figure 30) et **phylogénétique** (Figure 11) et le plus pertinent étant donné le **tropisme naturel** du virus pour les hépatocytes.

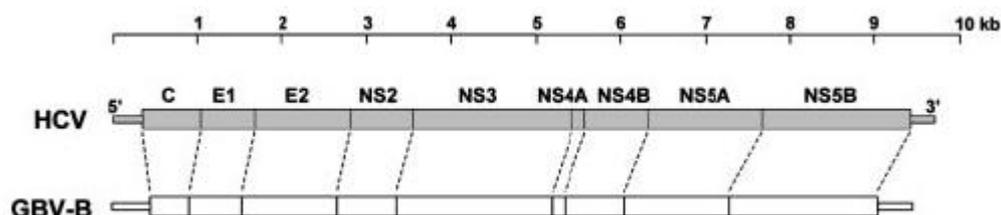


Figure 30 : Alignement des génomes du VHC et du GBV-B. (Martin *et al.*, 2003)

Il induit une hépatite aiguë et des cas d'hépatite chronique ont été décrits chez des tamarins sains, fournissant ainsi un modèle *in vivo* de type petit-primate (Martin *et al.*, 2003). Un modèle de culture primaire d'hépatocytes de tamarins permettant des niveaux élevés (100 fois l'inoculum) et un suivi facile de la réplication du GBV-B a été décrit (Beames *et al.*, 2000). Il a permis de réaliser des analyses génétiques de la réplication (*via* des clones chimériques notamment) ou l'étude d'inhibiteurs de la réplication du VHC et des virus apparentés (Beames *et al.*, 2001).

2.2 - VIRUS DE LA DIARRHÉE BOVINE (BVDV)

Le BVDV, un pestivirus, présente une organisation génétique et un modèle de réplication et d'expression génomique voisins du VHC (Miller et Purcell, 1990). De plus, il se réplique très facilement en culture cellulaire. Il existe plusieurs souches de BVDV, cytopathiques ou non cytopathiques (Hamers *et al.*, 2001). L'étude des souches cytopathiques rend les analyses fonctionnelles plus aisées avec l'observation de l'effet cytopathique induit par la réplication du BVDV. Dans ce modèle il a pu par exemple être montré que la ribavirine avait un effet antiviral direct sur la réplication du BVDV en culture de cellules BT (Escuret *et al.*, 2002). Plus généralement, il a été montré l'intérêt du modèle BVDV dans l'évaluation de nouvelles molécules antivirales potentiellement actives contre le VHC (Buckwold *et al.*, 2003).

2.3 - LE MODELE DU POLIOVIRUS

Le poliovirus est également un virus à ARN de polarité positive. Plusieurs études se sont intéressées à ce virus pour par exemple tenter de déterminer le mode d'action de la ribavirine, une question qui n'est toujours pas résolue alors que la ribavirine est le traitement contre le VHC. Dans ce modèle, la ribavirine est un agent mutagène et possède une action antivirale en forçant les virus à ARN à « l'erreur catastrophe » et la production massive de mutants défectifs (Crotty *et al.*, 2001; Crotty *et al.*, 2000).

3 - MODELES D'ETUDES DE LA REPLICATION VIRALE EN CULTURE CELLULAIRE

Les virus sont des « parasites cellulaires » obligatoires et l'étude de leur cycle de réplication nécessite des cellules hôtes permissives. De nombreux systèmes de cultures cellulaires infectées par le VHC ont été décrits, mais jusqu'à récemment, aucun n'avait permis d'obtenir des taux de réplication significatifs. Il s'agit soit de **culture de cellules primaires** provenant de patients infectés, soit de **l'infection *in vitro* de cellules en culture**.

3.1.1 - INFECTION D'HEPATOCYTES EN CULTURE

L'infection et la réplication productive de virus dépendent de facteurs de la cellule hôte qui ne sont parfois exprimés que dans des cellules hautement différenciées. C'est pourquoi des cultures primaires d'hépatocytes de chimpanzés, de tupaïas ou d'hépatocytes humains infectés *in vivo* ou *in vitro* ont été utilisées pour propager le VHC en culture cellulaire.

Des équipes ont inoculé des **hépatocytes primaires humains fœtaux** avec du sérum contenant du VHC. Ils ont mesuré une augmentation de 20 fois de la quantité d'ARN de polarité positive mesuré par RT-PCR dès le 5^{ème} jour post-infection et durant 24 jours de culture. Cependant, l'efficacité du système est faible avec une détection maximale de 20 000 copies d'ARN du VHC pour 10⁶ cellules (Iacovacci *et al.*, 1997). Le même type de résultat a été observé après inoculation **d'hépatocytes primaires de chimpanzés** (Lanford *et al.*, 1994). Les **hépatocytes primaires de *Tupaia belangeri*** sont également infectables par du sérum humain contenant du VHC. Ils permettent la réplication du virus, mise en évidence par l'observation de la synthèse *de novo* d'ARN du VHC, une évolution de la quasiespèce virale et la détection des protéines du VHC. La production de particules virales infectieuses dans ce modèle a été démontré par passage à des hépatocytes initialement non infectés (Zhao *et al.*, 2002).

Le système *in vitro* le plus proche de l'infection naturelle chez l'Homme est représenté par les **hépatocytes humains adultes normaux en culture primaire**. Des conditions de culture d'hépatocytes primaires humains pendant au moins

quatre mois sans changement morphologique ont été décrites. Cependant, après infection de ces cellules par le VHC, le taux de réplication virale est resté faible et l'ARN(-) n'a été détecté que de façon intermittente. L'infectabilité des cultures est peu reproductible et dépend de la qualité des hépatocytes du donneur. L'infectiosité du sérum servant à l'infection est également fonction de la présence d'anticorps. Cependant, le séquençage de HVR1 de E2 a montré la diminution de la complexité des quasi-espèces virales au cours de l'infection *in vitro*, suggérant qu'une réplication efficace est bien présente même si elle est variable en fonction des conditions expérimentales (Rumin *et al.*, 1999). En outre, ce modèle permet d'étudier les interactions du virus avec les molécules réceptrices et les mécanismes de neutralisation. Il a permis de montrer que l'IFN- α inhibe directement la réplication du VHC au sein des hépatocytes infectés (Castet *et al.*, 2002).

Des systèmes de **culture de cellules isolées de patients infectés chroniquement** ont également été envisagés. La culture d'hépatocytes primaires à partir de biopsies hépatiques a permis de détecter la réplication de VHC mais son efficacité est restée faible (Ito *et al.*, 1996).

Pour pallier l'insuffisance de ces systèmes et la difficulté d'obtention de ce type de matériel, des **lignées d'hépatomes humains Huh-7, HepG2** (Lohmann *et al.*, 1999 ; Seipp *et al.*, 1997) et des **lignées d'hépatocytes PH5CH non néoplasiques** ont été développées. La lignée PH5CH a été obtenue par immortalisation d'hépatocytes humains avec un antigène de virus simien. Parmi toutes les lignées d'hépatocytes humains analysées cette lignée s'est avérée être la plus susceptible à l'infection par le VHC (Ikeda *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1996). Concernant les lignées **HepG2 et Huh-7**, différentes conditions de culture cellulaire ont été testées pour essayer d'augmenter l'infection par le VHC. Exception faite des résultats obtenus avec le clone de Wakita (voir p. 55), le taux de réplication du VHC était faible : seulement 10^4 équivalents génomes ont été détectés dans le surnageant de culture de 10^6 cellules (Seipp *et al.*, 1997).

3.1.2 - INFECTION DE LIGNEES LYMPHOCYTAIRES

Si le foie est la cible principale de la réplication du VHC *in vivo*, la présence d'ARN(+) et (-) a été démontrée dans les **cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC)**. Le lymphotropisme du VHC pourrait expliquer les désordres immunologiques, en particulier les cryoglobulinémies de type II et III, observés chez plus de 50% des patients atteints d'hépatite C chronique (Agnello *et al.*, 1999 ; Rumin *et al.*, 1999).

Des cultures fraîches de PBMC provenant de dix donneurs différents ont été préparées et infectées avec deux sérums différents contenant des titres élevés de VHC. Le taux d'ARN du VHC détecté est cependant resté très faible et dépassait de peu le taux d'ARN inoculé (Cribier *et al.*, 1995). Des PBMC provenant de patients infectés chroniquement ont aussi été utilisées, mais la réplication dans ces cellules est restée très faible (Muller *et al.*, 1993).

Compte tenu des difficultés liées au travail en culture de cellules primaires, des **lignées de lymphocytes T (LyT) HPBMa et Molt4Ma** (Shimizu *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1993), et de **lymphocytes B (LyB) Daudi humains** permettant la propagation à long terme du VHC ont été utilisées (Nakajima *et al.*, 1996). Le VHC présent dans les surnageants des cellules Daudi a permis une transmission du virus après inoculation à des chimpanzés, bien que l'infectiosité ait été très faible. L'ARN viral était détectable dans le sérum de l'animal cinq semaines après inoculation intraveineuse et n'était plus retrouvé après 25 semaines. Le séquençage de la région hypervariable de E2 a révélé que le génome viral présent dans le sérum de l'animal correspondait à la quasi-espèce majoritaire présente dans le sérum du patient ayant servi à infecter les cellules Daudi. De plus, les PBMC du chimpanzé contenait un variant prédominant correspondant à celui retrouvé dans les cellules Daudi et non dans le sérum du patient. Ceci suggère la sélection d'un variant VHC à tropisme lymphocytaire durant le passage en cellules Daudi (Shimizu *et al.*, 1998).

3.2 - LES REPLICONS VHC

Le développement d'un système cellulaire permettant la réplication de tout ou partie du génome viral était l'un des objectifs principaux des recherches sur les modèles d'étude du VHC.

Une avancée majeure a eu lieu en 1999 avec la mise au point d'un système de culture cellulaire avec un réplicon sous-génomique du VHC (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999). Cela a représenté une véritable révolution pour la recherche sur l'hépatite C. Il devenait possible pour la première fois d'avoir une réplication d'un ARN sous génomique du VHC et ce en culture de cellules hépatocytaires.

Le système « réplicon » est basé sur une construction chimérique bicistronique illustrée par la Figure 31. Le domaine comprenant l'extrémité 5' non codante du VHC, incluant l'IRES et 12 codons de la protéine de capsid sont fusionnés en phase avec le gène de résistance à la néomycine. A sa suite, l'IRES du virus EMCV dirige la traduction des protéines non structurales du VHC ; la construction se termine avec l'extrémité 3' non codante du génome viral. En comparaison avec le VHC, les réplicons sous génomiques sont donc dépourvus des séquences codant les protéines structurales, p7 et NS2 qui de façon intéressante ne s'avère pas nécessaire à la réplication de ces réplicons.

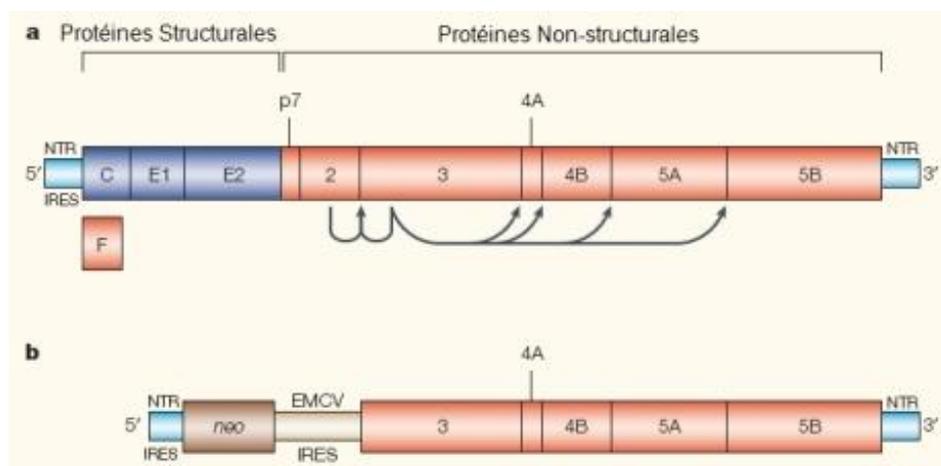


Figure 31 : Représentation schématique de l'organisation du génome du VHC (a) et d'un réplicon sous-génomique (b). (Bartenschlager, 2002)

Au niveau de la mise en place de ces réplicons (illustré par la Figure 32), un plasmide contenant les séquences du réplicon est réalisé puis *in vitro* transcrit via une ARN polymérase T7. L'ARN des réplicons sous-génomiques ainsi généré est transfecté dans la lignée d'hépatomes humains Huh-7, les cellules étant alors maintenues dans un milieu de culture contenant du G418. Les cellules qui n'ont pas eu de réplicon (en blanc) et les cellules dans lesquelles le réplicon ne se réplique pas (cellules orange) meurent à cause de la toxicité du G418. Seules les cellules dans lesquelles le réplicon VHC s'auto-réplique et contiennent un nombre suffisamment de copies du gène codant la néomycine phosphotransférase (qui inactive le G418) deviennent résistantes. Ces cellules survivent et peuvent former des colonies qui l'on peut isoler à partir de la culture et amplifier pour établir un clone cellulaire contenant de manière stable un réplicon VHC qui s'auto-réplique (Bartenschlager, 2002).

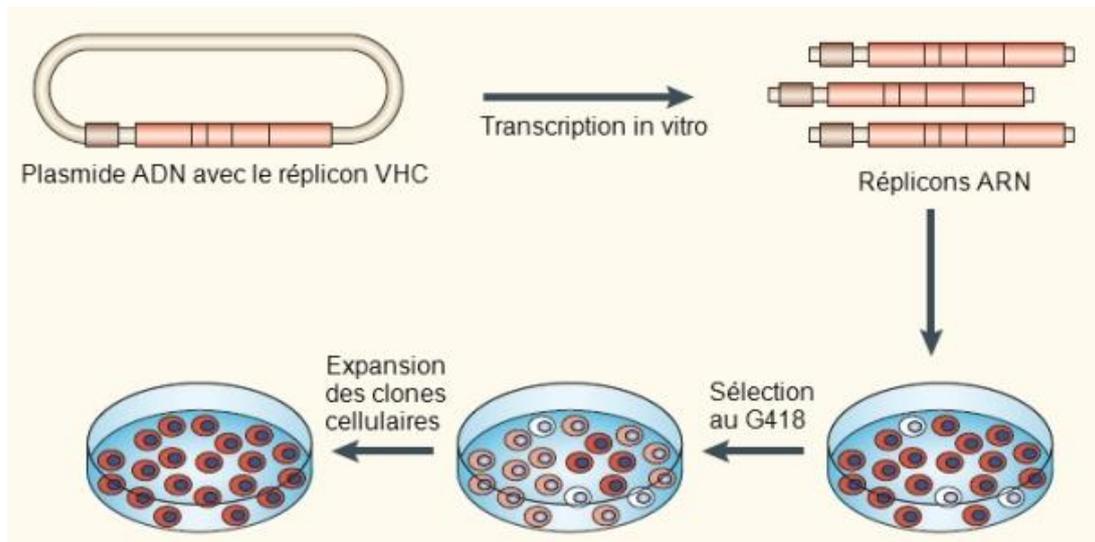


Figure 32 : Établissement de clones cellulaires comportant des réplicons HCV auto répliquant. (Bartenschlager, 2002)

Ce système, au départ limité aux réplicons issus de génotype 1b et à la lignée Huh-7, a été amélioré en générant des réplicons d'autres génotypes (1a, 2a, etc...) et d'autres lignées hépatocytaires. Des études ont montré qu'il y avait une adaptation réciproque des réplicons et des cellules dans lesquels ils se répliquaient, notamment par **apparition de mutations adaptatives** permettant d'augmenter significativement le nombre de colonies formées et donc la capacité de réplication du réplicon sous-génomique (Krieger *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001).

Ces mutations adaptatives se localisent au sein de la protéine NS5A essentiellement mais également dans NS3, NS4B et NS5B comme illustré par la Figure 33. Au niveau de l'hélicase NS3 (Figure 33A), deux résidus sont altérés à la surface de la molécule, R1283 et K1609. Dans le cas de NS5B (Figure 33B), c'est au niveau du sous domaine appelé « pouce » que l'on retrouve un remplacement d'une arginine par une glycine (R2884). Au niveau de NS5A, une mutation adaptative courante est la délétion de l'ensemble de l'ISDR et du site de liaison à la PKR, suggérant que ces régions ne sont nécessaires ni à la réplication de l'ARN viral en culture cellulaire, ni à sa persistance (Blight *et al.*, 2000).

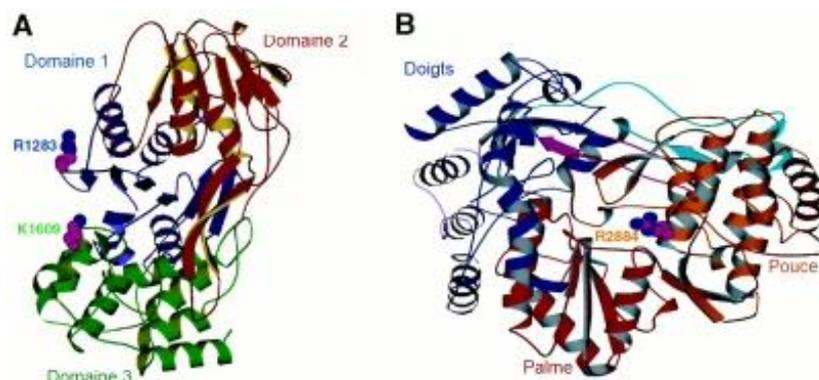


Figure 33 : Localisation des mutations adaptatives sur les structures en trois dimensions de l'hélicase NS3 (A) et de l'ARN polymérase ARN dépendante NS5B (B). (Lohmann *et al.*, 2001)

En ce qui concerne **l'adaptation des cellules au réplicon**, il a été montré dans le cas de la lignée Huh-7 que des clones mutés dans la protéine RIG-1 (voir p61), une protéine senseur du système de réponse immunitaire, étaient plus permissifs à l'installation des réplicons du VHC (Sumpter *et al.*, 2005a).

Des réplicons **génomiques** bicistroniques, contenant les gènes codant les protéines de structure ont été construits et des lignées stables obtenues (Blight *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2002; Pietschmann *et al.*, 2002). Ces constructions n'ont cependant pas permis la production de particules virales. Une hypothèse alors émise était que les cellules Huh-7

étaient déficientes pour un facteur cellulaire important pour la morphogénèse virale (*hypothèse aujourd'hui infirmée : voir 3.3 - Système de répllication complet*). Il est aujourd'hui admis que les ARN du VHC contenant les mutations adaptatives autorisant une meilleure répllication en cultures de cellules ne sont pas infectieux (Bukh *et al.*, 2002).

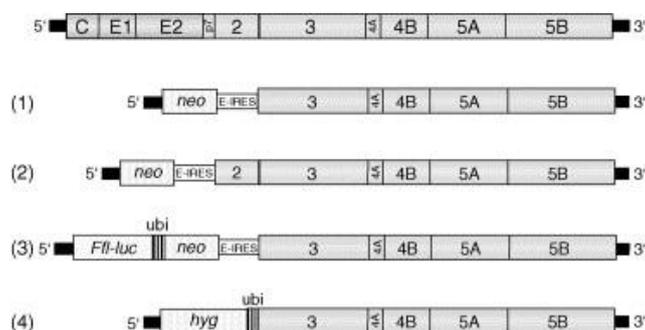


Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation génomique du VHC et des réplicons dérivés. (Bartenschlager, 2005)

De nombreux **dérivés du réplicon original** (No. 1 sur la Figure 34) ont été générés. Le dérivé le plus intéressant dans le cadre de nos études est le réplicon qui comporte en plus du gène de sélection à la néomycine le gène codant la luciférase Firefly (No.3 sur la Figure 34). Avec ce type de réplicon, il est possible d'estimer facilement la répllication sous-génomique du VHC en suivant la quantité de luciférase présente dans les cultures.

Au final, même si de nombreuses questions ont été soulevées par le caractère complètement artificiel du système, il faut garder à l'esprit que sa mise au point, 10 ans après la découverte du VHC, a permis de progresser de manière considérable dans la compréhension du virus et donc dans la mise au point de nombreux inhibiteurs à visée thérapeutique. C'est également en cherchant à comprendre pourquoi des réplicons « génomiques » ne fonctionnaient pas qu'a été mis au point le système de répllication complet du VHC (Bartenschlager, 2005).

3.3 - SYSTEME DE REPLICATION COMPLET

Cette dernière avancée majeure a eu lieu en 2005. Trois équipes ont publié séparément au début du mois de juin leurs travaux décrivant la production de particules virales infectieuses en culture cellulaire : l'équipe de Ralf Bartenschlager à Heidelberg (Allemagne), l'équipe dirigée par Franck Chisari au Scripps Research Institute à La Jolla (Californie) et l'équipe de Charles Rice (Rockefeller University, New York). Elles ont étudié le même isolat viral, cloné par l'équipe de Takeji Wakita (Tokyo), et à partir de lignées cellulaires équivalentes ont mis en évidence la mise au point d'un **système cellulaire de répllication complet du VHC** (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

HISTORIQUE

A l'origine de ces avancées, il y a eu l'identification par l'équipe japonaise d'une souche virale C responsable d'une **hépatite fulminante de génotype 2**, nommée JFH1 (Kato *et al.*, 2001). Cette même équipe a poursuivi la caractérisation de cette souche en développant un **réplicon fonctionnel**, le premier à ne pas être de génotype 1 (Kato *et al.*, 2003).

T. Wakita a collaboré par la suite avec l'équipe de R. Bartenschlager afin d'étudier les conséquences de la transfection du génome complet de l'isolat JFH1 dans les cellules Huh-7. Il put ainsi mettre en évidence la production de particules virales infectieuses dans le surnageant de culture. Cependant, le système nécessitait d'être amélioré du fait de la quantité limitée de virus produits et de la propagation restreinte du VHC en culture (Wakita *et al.*, 2005).

Des améliorations ont été apportées par les équipes de F. Chisari (Zhong *et al.*, 2005) et C. Rice (Lindenbach *et al.*, 2005), avec l'utilisation d'une lignée cellulaire dérivée de Huh-7 (le clone Huh-7.5), particulièrement permissive pour

la réplication du HCV. L'équipe de F. Chisari, avec la collaboration de T. Wakita, a étudié le même génome complet de l'isolat JFH1, alors que l'équipe de C. Rice a construit un **génomme complet chimérique de génotype 2a**, comportant la région structurale ainsi que les régions codant les protéines p7 et NS2 de l'isolat J6 (génotype 2a) suivies de la région non structurale (NS3 à NS5B) de l'isolat JFH1.

Les **cellules Huh-7.5** permettent également d'obtenir une forte réplication virale. C'est une sous-population de cellules Huh-7 obtenue après établissement d'un réplicon sous-génomique du VHC et clairance de l'ARN par un interféron- α . Il est aujourd'hui établi que ces cellules sont hautement permissives à l'infection du fait de leur déficience pour l'expression de RIG-1 (voir p. 63). Dans ce cas, des rendements de production jusqu'à 50 fois plus élevés, ainsi qu'une meilleure propagation de l'infection en culture *in vitro* sont observés. En outre, le pouvoir infectieux des particules virales produites est conservé après de multiples passages en culture et les particules ayant donné lieu à une infection *in vivo* restent infectieuses *in vitro* (Lindenbach *et al.*, 2006).

PROTOCOLE

Dans le détail, présenté dans la Figure 35, les transcrits ARN issus du génome chimérique JFH1/J6 (deux génotype 2a) sont transfectés dans des cellules Huh-7.5 ; les surnageants sont filtrés et utilisés pour infecter des cellules Huh-7.5 naïves. Les immunomarquages présents ont été réalisés avec un anticorps monoclonal de souris anti-NS5A. Les virus titrés ont été inoculés dans deux chimpanzés par voie i.v. et deux souris SCID-uPA avec une greffe de foie humain par voie i.p. Le sérum d'une de ces souris virémiques a entraîné l'infection VHC d'une troisième souris. L'infectiosité spécifique (rapport du titre infectieux / titre ARN) a été déterminé dans des cellules Huh-7 naïve, chez le chimpanzé et chez la souris contenant le virus chimérique J6/JFH1. Le TCID₅₀ (*tissue culture 50% infective dose*) est indiqué.

PERSPECTIVES

Une limitation subsiste cependant, puisque le système développé ne permet actuellement d'étudier qu'un seul des 6 génotypes du HCV. De plus, la question concernant la particularité de cet isolat JFH1 demeure en suspens. Les réponses résident probablement dans la région non structurale du génome, seule partie commune étudiée conjointement par les trois équipes et qui semblent se préciser avec les premières données publiées (Pietschmann *et al.*, 2006).

Au-delà de ces remarques, le système est prometteur pour l'étude des **premières étapes du cycle viral**, les **étapes d'attachement** et **d'entrée du virus**. En effet, les expériences de neutralisation de l'infection réalisées séparément par les trois équipes ont conforté l'importance du rôle de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC, ainsi que celui de la tétraspanine CD81 dans l'entrée virale. De plus, les expériences préliminaires conduites ont démontré la robustesse du système pour évaluer l'efficacité de molécules antivirales spécifiques en cours de développement ou en devenir.

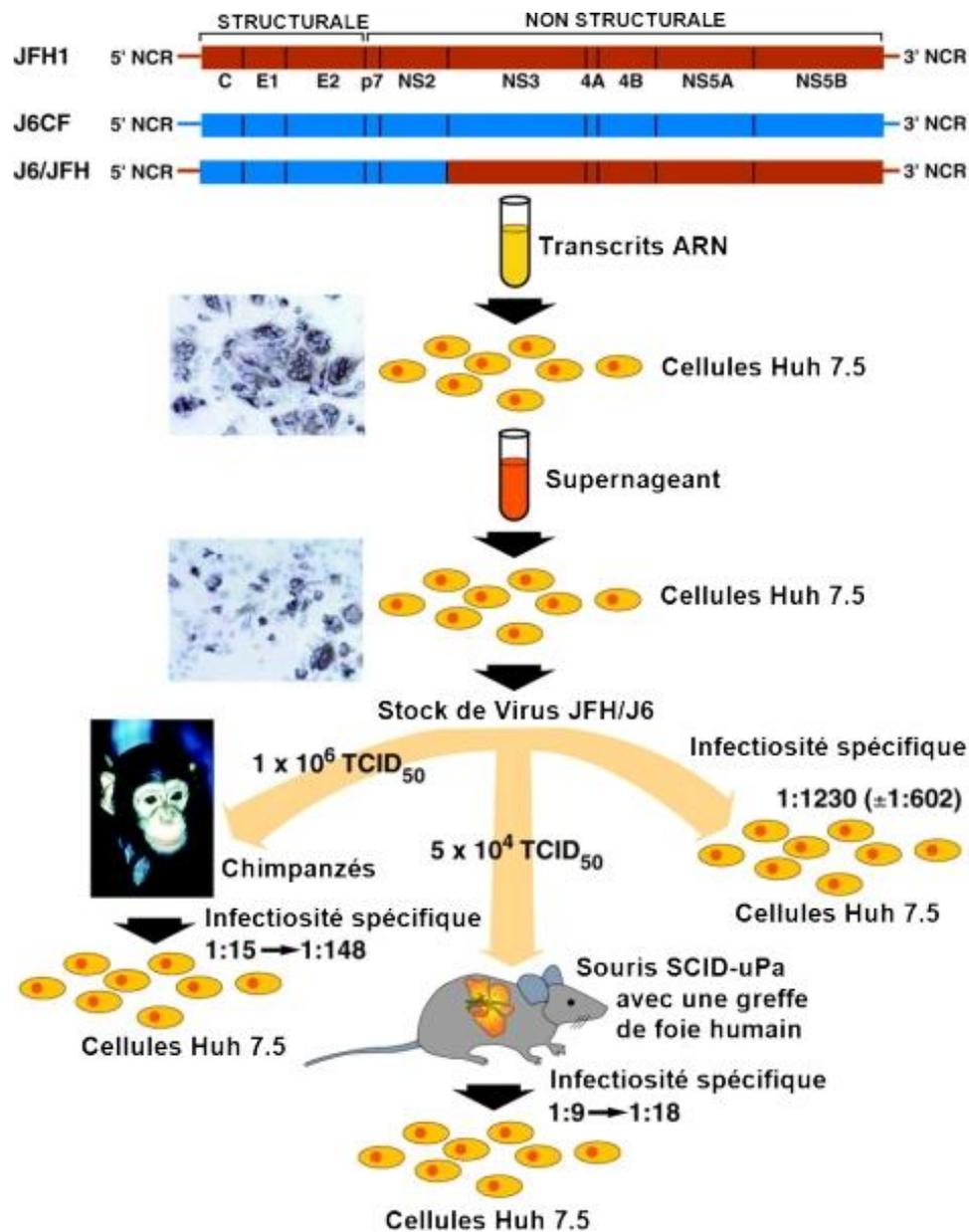


Figure 35 : Génération des virus J6/JFH1 en culture cellulaire et démonstration de leur infectiosité *in vivo*. (Bukh et Purcell, 2006)

4 - SYSTEMES D'EXPRESSION *IN VITRO*

A côté des systèmes de réplication complets ou incomplets en modèles animaux ou cellulaires, il existe de nombreuses possibilités d'études du VHC ciblées sur une protéine ou une région. Voici un bref aperçu pour introduire le système d'expression bicistronique en lysat de réticulocytes utilisé dans une de mes études et le système des pseudo-particules, une autre avancée récente majeure.

4.1 - PSEUDO-PARTICULES RETROVIRALES

Après la mise au point du système réplicon, une autre approche couronnée de succès a été la mise au point du système des **pseudo-particules**. Ce système basé sur le pseudotypage de nucléocapsides rétrovirales avec les glycoprotéines d'enveloppe du VHC a permis de faire d'énormes progrès sur la compréhension de l'entrée virale et d'avancer vers la mise au point d'un vaccin (Bartosch *et al.*, 2003b).

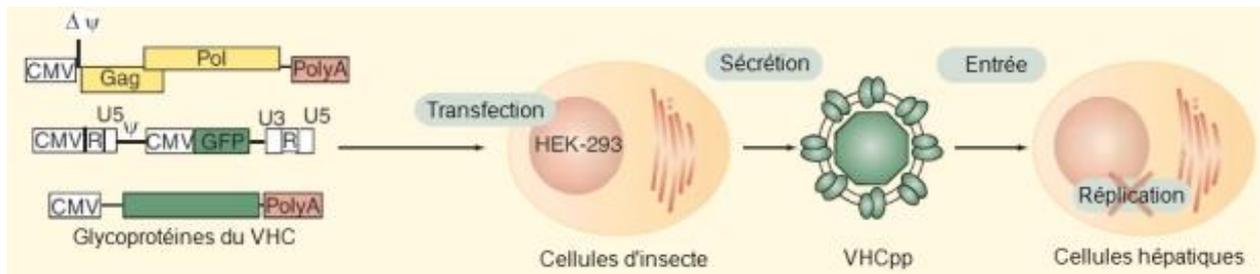


Figure 36 : Le système des pseudo-particules virales. (Chapel *et al.*, 2006b)

4.2 - PLASMIDES BICISTRONNIQUES POUR L'ETUDE DES REGIONS UTR

Une autre approche pour étudier une partie du VHC est d'utiliser des **plasmides bicistroniques**. Dans ce type de constructions, la séquence codant l'IRES du VHC et une partie de la séquence codant la protéine de capsidie initie de manière interne la traduction d'une luciférase. Une autre luciférase est traduite de manière classique et permet de réaliser des ratios transcription coiffe-dépendante vs transcription IRES dépendante (Figure 37).

Pour utiliser ces constructions, classiquement une transcription *in vitro* est réalisée et les ARN obtenus sont traduits dans un lysat de réticulocytes de lapins par une T7 ARN polymérase. Il est également possible de réaliser une transcription/ traduction couplées en lysat de réticulocyte à partir du plasmide, comme nous l'avons fait dans l'étude 2 et 3.

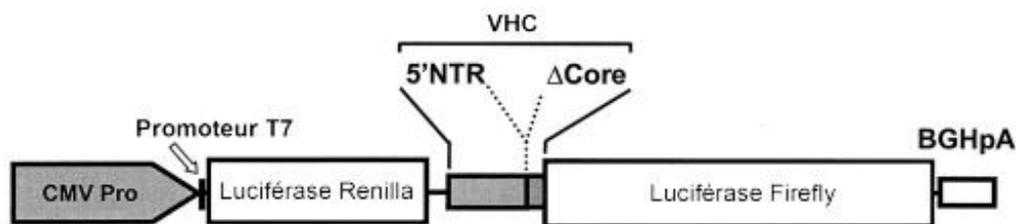


Figure 37 : Exemple d'un système bicistronique. (Lerat *et al.*, 2000)

Le défaut majeur de ce système réside dans la difficulté à déterminer de manière précise les **séquences minimales nécessaires au fonctionnement de l'IRES** (Collier *et al.*, 1998). Plus généralement, l'isolement de la séquence IRES du reste du génome est problématique et son fonctionnement ainsi isolé est sujet à caution. Il a en effet été montré que la traduction pouvait dépendre de l'interaction de la région 5'UTR avec le partie 3'UTR *via* la protéine PTB - voir p41 - (Wang *et al.*, 2005a) (bien que cela soit contesté (Brocard *et al.*, 2006)) et que la région codant la protéine de capsidie (Li *et al.*, 2003) ou la protéine de capsidie elle-même (Boni *et al.*, 2005; Shimoike *et al.*, 2006) pouvait agir sur la traduction IRES dépendante.

En dépit de ces défauts, de telles constructions ont permis l'étude de la **structure de l'IRES** (Honda *et al.*, 1999), la caractérisation des **différences entre les génotypes** (Collier *et al.*, 1998), l'activité de l'IRES du VHC en fonction du **type cellulaire** (Lerat *et al.*, 2000) et du **cycle cellulaire** (Honda *et al.*, 2000), son interaction avec des **cofacteurs** protéiques tels que la protéines PTB (Tischendorf *et al.*, 2004) et bien sûr permis l'étude d'inhibiteurs de type **antisens** (McCaffrey *et al.*, 2003; Nulf et Corey, 2004b). Récemment, une étude qui montre que la protéine de capsidie du VHC est un inhibiteur de l'interférence ARN a utilisé pour l'évaluation de l'activité de l'enzyme DICER (voir p98) une construction bicistronique (Wang *et al.*, 2006).

C'est donc un outil particulièrement intéressant pour **évaluer un nombre important de molécules** dirigées contre l'IRES en permettant une sélection rapide en vue de test en culture de cellules. C'est pour ces raisons que nous nous sommes orientés vers ce modèle pour nos études.

III - LES TRAITEMENTS ACTUELS ET FUTURS DU VHC

Bien que l'expression clinique de l'infection par le VHC soit relativement peu symptomatique, l'impact de l'infection chronique sur la mortalité du patient est particulièrement important. Le traitement vise donc à la fois à prévenir l'installation ou faire régresser une fibrose/cirrhose et à prévenir la survenue d'un CHC. Cet objectif n'étant évaluable qu'à long terme (10 – 30 ans), sa mesure objective est difficile voire impossible en raison des nombreux facteurs associés au développement de la maladie.

Aussi il est aujourd'hui admis que l'objectif des traitements anti-HCV est l'obtention d'une réponse virologique soutenue (RVS) définie par la négativation de l'ARN du VHC dans les 24 ou 48 semaines après la fin du traitement. Récemment ce critère a été affiné par la mesure d'une réponse virologique précoce (baisse de 2log à 3 mois de traitement). Cet objectif est mesurable et rationnel car il a été montré que l'arrêt global de l'infection s'accompagne toujours d'un arrêt de la progression vers la fibrose.

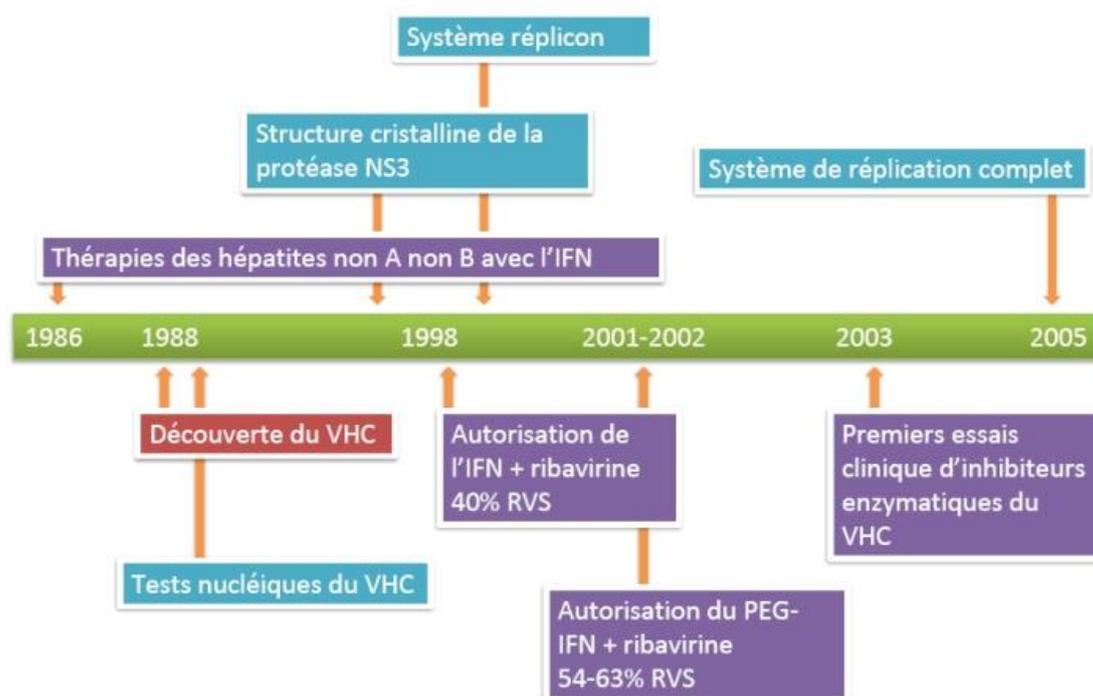


Figure 38 : Étapes majeures de la recherche sur le VHC. (Manns, 2006)

Comme introduit dans la partie précédente, le traitement de l'hépatite C a évolué avec les modèles d'étude disponibles (Figure 38). Dès 1986 les hépatites non A non B étaient traitées par l'interféron ; en 1998 ont été approuvées les combinaisons IFN + ribavirine et depuis 2001-2002 le traitement du VHC est une combinaison IFN pégylé (PEG-IFN) et ribavirine (RBV). Beaucoup de molécules sont en développement et plusieurs déjà en phases d'essais cliniques.

L'objectif de cette partie est de présenter la **bithérapie actuelle** (interféron + ribavirine) et de développer les **perspectives thérapeutiques** en détaillant les **améliorations de la bithérapie** actuelle, les futurs **inhibiteurs spécifiques** du VHC et des possibilités de développement d'un **vaccin**.

A - INTERFERON ET RIBAVIRINE

1 - LES INTERFERONS

L'interféron (IFN) a été identifié comme un agent antiviral lors d'études réalisées sur l'interférence virale (Isaacs et Lindenmann, 1957; Nagano et Kojima, 1958). Ces auteurs ont rapporté en 1957 que des cellules de poulet infectées par le virus Influenza sécrétaient un facteur qui conférait un état de résistance à la fois vis à vis de virus homologues et hétérologues. Ces observations, complétées par des résultats similaires en 1958 ont été le point de départ des études qui ont conduit à la description détaillée du système IFN. Une protéine fonctionnelle responsable de cette inhibition du virus et produite par des lymphocytes activés a par la suite été décrite (Wheelock, 1965). Considérée alors comme un antiviral assez mystérieux, elle a laissé sceptiques de nombreux scientifiques, finalement convaincus vingt ans plus tard par le clonage de l'ADNc et l'identification des gènes de l'IFN (Gray et Goeddel, 1982; Nagata *et al.*, 1980; Taniguchi *et al.*, 1979)

Schématiquement (Figure 39), ce système inclut d'une part des **cellules qui synthétisent de l'IFN** en réponse à un stimulus extérieur comme une infection virale, et d'autre part des **cellules qui répondent à l'IFN** en établissant un état antiviral (Pestka *et al.*, 1987; Samuel, 1991; Stark *et al.*, 1998). Les virus animaux sont en général des inducteurs de l'IFN mais sont aussi sensibles à l'action antivirale des ceux-ci ; dans certains cas, ils peuvent coder des protéines capables de lutter contre les réponses antivirales de l'IFN. Les interférons représentent la réponse précoce de l'hôte qui a lieu avant toute réponse immunitaire spécifique. Ils affectent de nombreux processus incluant la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la modulation de la réponse immune (Samuel, 2001).

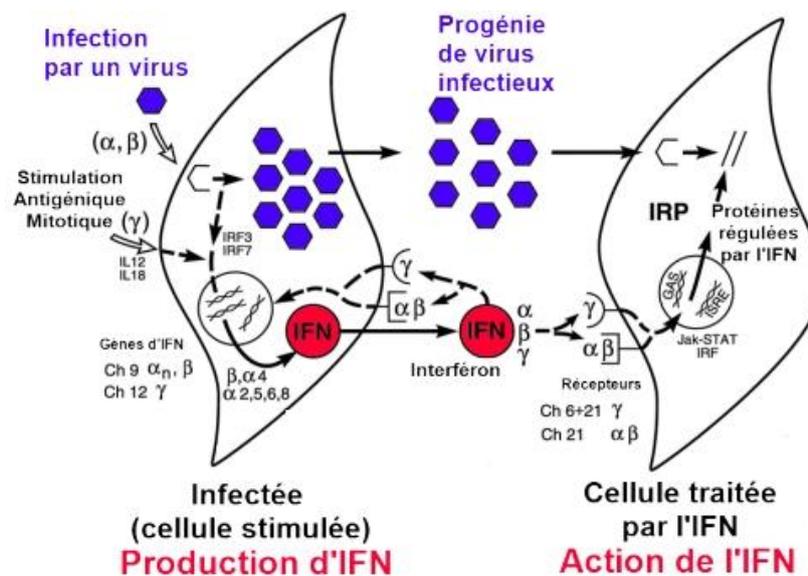


Figure 39 : Résumé schématique du Système IFN. (Samuel, 2001)

1.1 - LES DIFFERENTS INTERFERONS

Les interférons sont une famille multigénique dans laquelle on distingue **deux types d'interférons**. Les IFN- α , β , κ , ω et ϵ font partie des interférons de type I. L'IFN- γ est le seul membre des interférons de type II. Une nouvelle famille d'IFN, regroupant trois IFN- λ a enfin été décrite récemment (Kotenko *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2003) et n'est pas à ce jour classé dans un type particulier. En pratique, les IFN- α , β et γ sont les trois classes majeures.

L'IFN- α comprend près d'une vingtaine de sous-types dont les gènes présentent 95% d'homologie entre eux. Il est produit par les cellules hématopoïétiques. Les gènes codant pour l'IFN- α peuvent être divisés en deux groupes. Un gène de réponse précoce immédiate (IFN- $\alpha 4$) qui est induit rapidement et sans besoin de synthèse protéique supplémentaire, et différents autres gènes (IFN- $\alpha 2$, IFN- $\alpha 5$, IFN- $\alpha 6$, IFN- $\alpha 8$), qui sont induits de façon retardée

(Marie *et al.*, 1998). Au total, il existe **13 gènes codant pour l'IFN- α** . La raison pour laquelle il existe autant de gènes codant pour l'IFN- α n'est cependant pas connue (Roberts *et al.*, 1998).

L'IFN- β est produit par les fibroblastes et les cellules épithéliales. Il n'y a qu'un gène codant pour l'IFN- β qui présente 30% d'homologie avec la famille des gènes des IFN- α . Les gènes des **IFN- α et le gène de l'IFN- β n'ont pas d'introns** et sont tous regroupés au niveau du **bras court du chromosome 9 chez l'homme**. Ils codent des polypeptides de 165 ou 166 acides aminés. Bien que certains interférons soient modifiés après traduction par N- et O-glycosylation, la plupart des **IFN- α ne sont pas glycosylés** ; au contraire, **l'IFN- β est glycosylé**.

L'IFN- γ est synthétisé seulement par certaines cellules du système immunitaire : les cellules NK (natural killer) et les cellules Th1 CD4 et Th1 CD8 cytotoxiques. Le seul gène de l'IFN- γ possède **trois introns**. Il est situé sur le bras long du **chromosome 12 chez l'homme**.

Récemment, une nouvelle famille de cytokines, les **IFN- λ 1, 2, 3** (ou **IL-29, IL-28A, et IL-28B** respectivement) a été caractérisée. Ces cytokines ont une structure proche de celle des IFN de type I, mais l'organisation de leur séquence est proche de celle de la famille des protéines de l'IL-10. Comme les autres IFN, ces IFN- λ protègent les cellules des infections virales et induisent l'expression d'antigènes du CMH de classe I. Les gènes codant pour les trois membres de la famille des IFN- λ sont situés sur le **chromosome 19** chez l'homme. Ces gènes contiennent des **exons multiples**, tandis que les IFN de type 1 sont codés par un seul exon. En outre, les IFN- λ représentent un lien intéressant au niveau de l'évolution entre IFN de type I et la famille de l'IL-10. En effet, les protéines IFN- λ ont une structure proche de celle des IFN de type I, mais leur structure génomique ressemble à celle de la famille de l'IL-10 (Kotenko *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2003).

1.2 - BIOSYNTHESE DES IFN AU COURS DE L'INFECTION VHC

L'infection virale initie une série d'événements intracellulaires qui génèrent un état antiviral directement au sein des cellules infectées et indirectement dans les tissus à proximité. En réponse, les virus possèdent des stratégies pour échapper aux défenses de l'hôte. C'est ces deux aspects que nous allons analyser.

1.2.1 - REPONSE DE LA CELLULE HOTE A L'INFECTION PAR LE VHC

Le virus infectant est identifié par le profil moléculaire qui lui est associé (PAMP), reconnu par des récepteurs spécifiques présents sur les cellules de l'hôte. Dans le cas des virus à ARN comme le VHC, les protéines et les ARN simple ou double-brin sont reconnus majoritairement par des récepteurs de type **TLR** (Toll-like receptors). Dans les hépatocytes, les ARN double-brin induisent un signal de défense de l'hôte, *via* **RIG-I** (Retinoic-acid-Inducible Gene I) et **TLR3** qui activent des facteurs de transcription cellulaires latents (Figure 40).

RIG-1

C'est une ARN hélicase capable de lier l'ARN du VHC au niveau de sa région C-terminale et qui contient une région amino-terminale homologue au domaine **CARD** (caspase activation and recruitment domain), un domaine capable de recruter et d'activer une caspase (Figure 40a). Le domaine hélicase de RIG-I est capable d'interagir avec les ARN double-brin, tandis que le domaine CARD de RIG-I est responsable de l'activation du signal en aval, en se liant au domaine CARD de protéines ancrées dans la membrane mitochondriale. Ces protéines sont un relais du signal d'activation induit par RIG-I vers les kinases qui permettront l'activation notamment d'IRF3 et NF κ B (Figure 40b). Ces protéines portent des noms différents car elles ont été nommées différemment après avoir été découvertes par différentes équipes de recherche : Cardif, MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), VISA (virus-induced signaling adaptor) ou IPS-1 (interferon promoter stimulator-1). Toutes possèdent un domaine CARD dans leur région N-terminale et sont ancrées dans la membrane mitochondriale par leur région hydrophobe C-terminale (Kawai *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005).

TLR3

C'est un récepteur de l'ARN double-brin, qui est actif par l'intermédiaire de TRIF (Toll-interleukine-1 receptor-domain-containing adaptor inducing IFN- β) qui lui est associé et qui agit comme adaptateur liant TLR3 aux kinases responsables de l'activation d'IRF-3 et NF κ B par leur phosphorylation (Figure 40c)

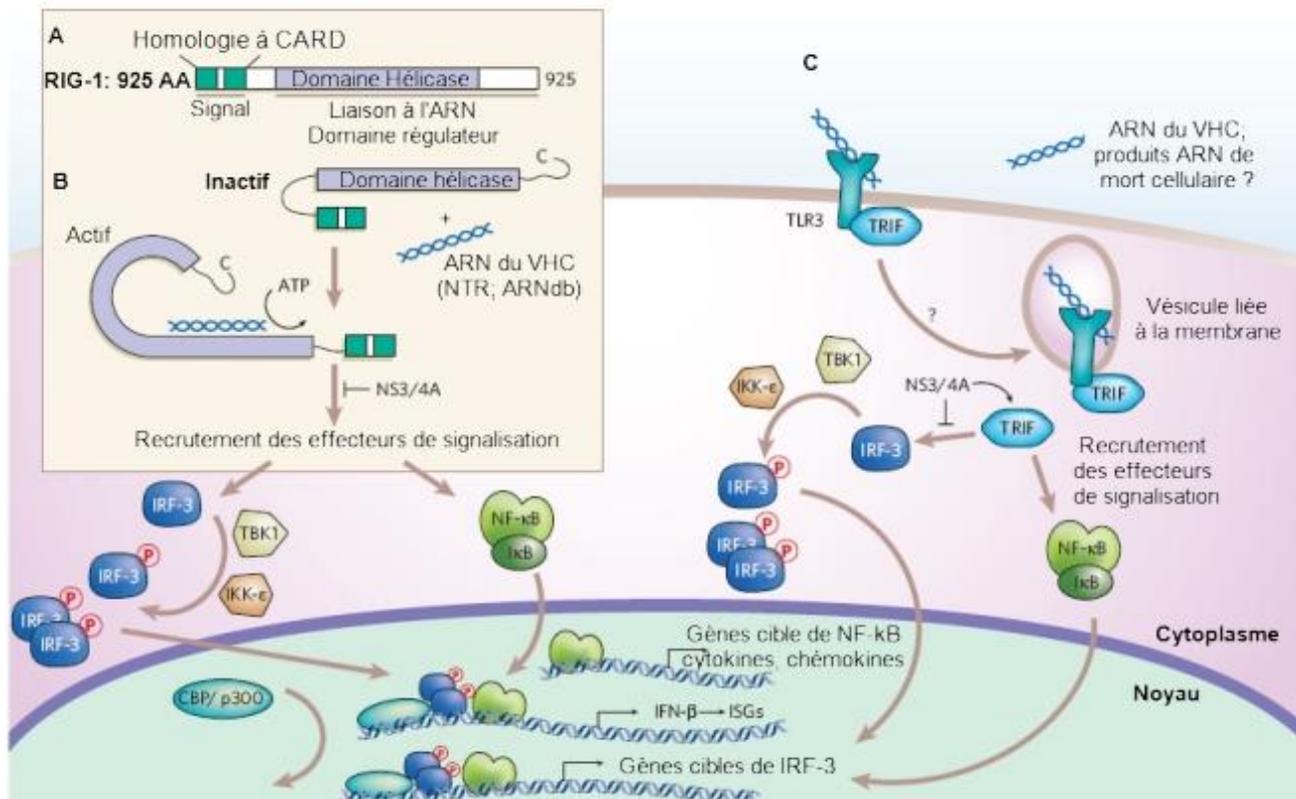


Figure 40 : Déclenchement de l'activation de IRF-3 par le VHC *via* RIG-1 ou TLR-3 et contrôle du signal par NS3-4A. (Gale et Foy, 2005)

La liaison d'ARN du VHC à RIG-1 ou TLR3 aboutit dans les deux cas à la **phosphorylation et à l'activation d'IRF-3** par les protéines kinases TBK1 et IKK- ϵ , ainsi qu'à la libération et à la translocation nucléaire de NF- κ B, par phosphorylation de son inhibiteur cytoplasmique I κ B. Les IRF constituent une famille de facteurs de transcription qui partagent un domaine d'homologie impliqué dans la liaison à l'ADN, et qui se fixent sur un motif ISRE (Interferon Sensitivity Responsive Element) qui correspond à une séquence consensus des IFN. Les dimères de IRF-3 phosphorylés sont ensuite transloqués dans le noyau de la cellule et interagissent avec leurs partenaires de transcription, dont CBP/p300 et NF- κ B, et se lient au niveau des PRD (Positive Regulatory Domain) adéquats situés dans la région promotrice des gènes cibles de IRF-3, dont celui codant pour l'IFN- β (Figure 40).

Après liaison d'ARN double-brin, TLR3 peut également induire la **phosphorylation d'IRF-7**, qui est à la fois un facteur de transcription et un gène stimulé par l'IFN (ISG). Après phosphorylation, IRF-7 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec IRF-3 phosphorylé, et se lie au niveau du VRE (Virus Responsive Element) lui correspondant dans la région promotrice des gènes de l'IFN- α . Les IFN- β et IFN- α sécrétés agissent alors selon des processus autocrine et paracrine en se fixant sur les récepteurs des IFN- α/β , activent les voies Jak-STAT et augmentent finalement la transcription de nombreux gènes stimulés par les IFN (ISG) selon des processus que nous décrivons plus loin (Figure 41).

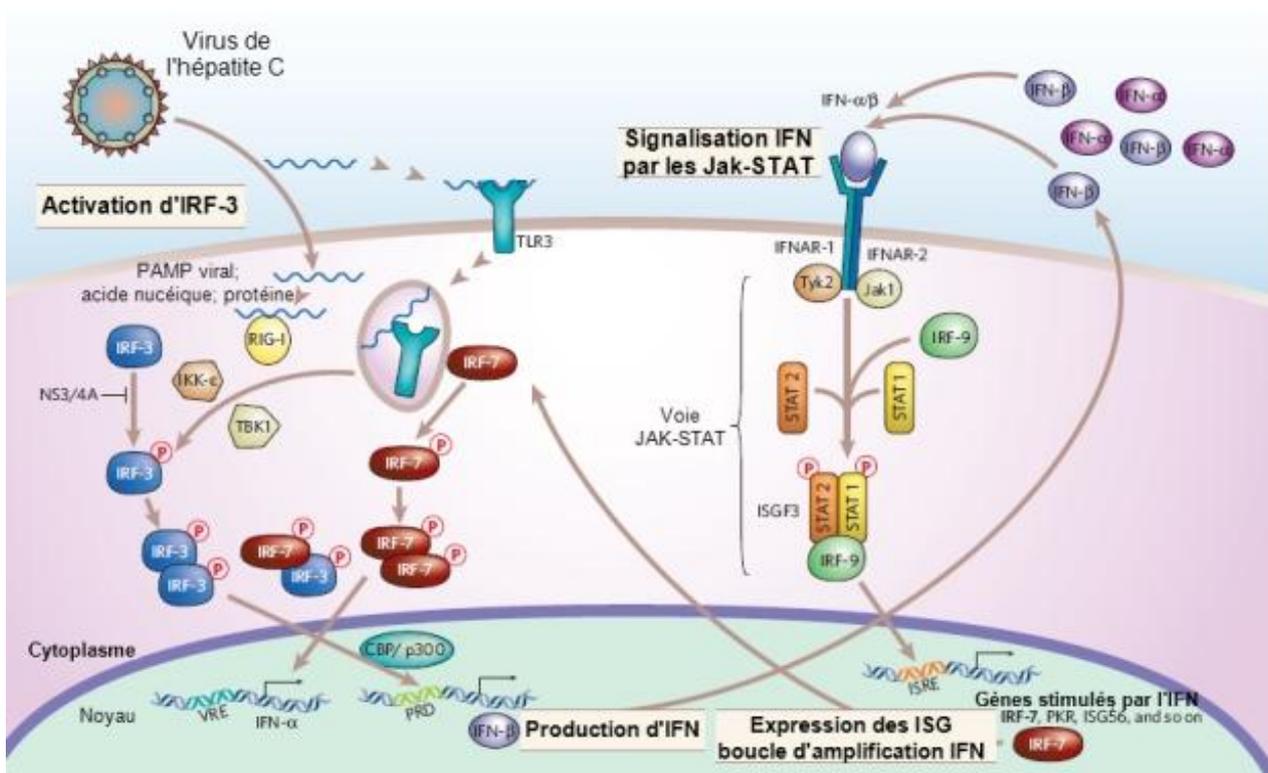


Figure 41 : Processus moléculaire signalant à l'hôte une infection du VHC. (Gale et Foy, 2005)

Outre les acides nucléiques viraux, les protéines virales, en s'accumulant dans la cellule, peuvent aussi stimuler la réponse de l'hôte ou activer des composants spécifiques de cette réponse. L'expression de NS5A induit un stress cellulaire et des voies de signalisation qui activent STAT3 (Gong *et al.*, 2001). STAT3 dirige l'expression de gènes par des processus qui impliquent la voie Jak-STAT (Sarcar *et al.*, 2004). Ceci aboutit à un profil d'expression de gènes qui incluent des ISG et des cytokines pro-inflammatoires pouvant influencer le niveau global de réplication du VHC (Zhu, 2003). De plus, la protéine de capsid semble activer la PKR (Delhem *et al.*, 2001). La liaison des particules virales aux cellules peut enfin déclencher une signalisation qui conduit à l'induction d'IFN. Il a été montré que des pseudo-particules du VHC fixées sur des cellules dendritiques conduisent à l'activation des DC, source majeure de production d'IFN au cours de l'infection virale (Barth *et al.*, 2005; Colonna *et al.*, 2004)

Enfin, bien qu'il y ait peu d'homologie de séquences entre les IFN- α/β et IFN- λ , les IFN- λ ont des propriétés biologiques communes avec les IFN- α/β . L'expression d'IFN- λ est induite par les stimuli qui activent les récepteurs TLR, tels que le poly(I)-poly(C), ou les infections virales par exemple. Comme les IFN- α/β , les IFN- λ activent la synthèse d'ISGF3, induisent l'expression de gènes contenant des ISRE, et sont capables d'inhiber la réplication de virus (Kotenko *et al.*, 2003; Shepard *et al.*, 2003).

1.2.2 - CONTROLE ET ECHAPPEMENT A LA REPOSE DE L'HOTE

L'échappement du VHC à la réponse de l'hôte est lié à sa capacité à contrôler l'expression ou la fonction de plusieurs gènes stimulés par l'IFN (ISG), comme montré dans le Tableau 2.

Stratégie Virale	Mécanisme d'action	Conséquences
Induction d'IL-8	NS5A induit la production d'IL-8 à travers un mécanisme impliquant l'activation des facteurs de transcription de NF- κ B et d'AP-1.	Diminue l'expression des ISG
Induction de l'expression de SOCS	La protéine de capside du VHC induit l'expression de SOCS1 et SOCS3	Bloque la voie de signalisation Jak-STAT <i>via</i> les récepteurs IFN- α / β .
Inhibition de la PKR	Les protéines NS5A et E2 se lient à la PKR et inhibent son action catalytique.	Perturbation de la signalisation et du contrôle de la traduction PKR dépendante.
Régulation d'IRF-1	NS5A bloque l'action d'IRF-1 induite par les ARNdb <i>via</i> l'inhibition de la signalisation PKR.	Allège la suppression d'IRF-1 par la réplication du VHC.
Échappement à la voie 2',5' OAS/RNase L	Séquence du génome du VHC	Le VHC de génotype 1 présente moins de sites de reconnaissance par la RNase L ce qui lui permet d'être protégé d'une dégradation nucléolytique.
Abolissement de la fonction de STAT1.	Protéines du VHC	Les protéines du VHC induisent l'expression de PP2A et une hypo-méthylation de STAT1 pour atténuer l'expression des ISG.
Suppression de l'expression d'ISG56	Protéines non-structurales du VHC	<i>In vitro</i> : NS3/4A et les protéines non-structurales perturbent la signalisation au promoteur ISG56. Élimine le blocage par ISG56 de la traduction virale.
Régulation de la signalisation <i>via</i> RIG-I	Blocage de la signalisation <i>via</i> la protéase NS3/4A .	La blocage de la signalisation <i>via</i> RIG-1 freine une boucle d'amplification qui conduirait à l'augmentation de l'expression des ISG.
Régulation de la signalisation <i>via</i> TLR3	Clivage de TRIF par la protéase NS3/4A .	Perturbation de la boucle d'amplification de l'IFN par la voie TLR3.

Tableau 2 : Régulation des ISG par le VHC. (Gale and Foy, 2005)

EXEMPLE DE NS3-4A

La protéase NS3-4A agit grâce à son action protéolytique en bloquant en amont les signaux de reconnaissance de l'infection virale, empêchant ainsi la phosphorylation de IRF-3 et bloquant la mise en place des voies de signalisation vers la synthèse d'IFN- α et - β (Figure 40). Ces observations suggèrent que la protéase NS3 clive les sites actifs des médiateurs de l'action de l'IFN à différents niveaux et que les traitements combinant IFN- α et un inhibiteur de la sérine protéase pourraient avoir une action synergique significative.

PERMISSIVITE A L'INFECTION

Dans le cas des cellules permissives à la réplication du VHC, la présence ou l'absence des différentes voies de défense induisant la synthèse d'IFN a un rôle majeur. Les cellules Huh-7 par exemple n'expriment pas TLR3 et ne répondent à l'administration de poly iC, ce qui peut expliquer leur permissivité à la réplication du VHC (Li *et al.*, 2005). Les cellules Huh-7.5, obtenues après clairance de l'ARN du VHC par traitement par IFN- α , sont hautement permissives à la réplication de l'ARN du VHC car il s'agit d'une sous-population de cellules Huh-7 déficientes pour l'expression de RIG-I (Sumpter *et al.*, 2005b).

1.3 - RECEPTEURS, SIGNAUX DE TRANSDUCTION

1.3.1 - RECEPTEURS DES IFN

Les interférons exercent leur action par l'intermédiaire de récepteurs présents à la surface cellulaire qui sont spécifiques à chaque espèce. Les produits des gènes de l'IFN- α se fixent à leur récepteur sous forme de monomères, tandis que les IFN- β et IFN- γ se fixent sous forme d'homodimères (Figure 42).

Les IFN- α , β et ω semblent avoir un récepteur commun qui est composé de deux sous-unités, IFNAR-1 et IFNAR-2. Les gènes codant pour ces sous-unités sont situés sur le chromosome 21 chez l'homme. Il n'existe qu'une seule forme d'IFNAR-1, tandis que différents clivages du transcrite du gène IFNAR-2 produisent des formes longues, courtes ou solubles de cette sous-unité.

L'IFN- γ se lie à un récepteur distinct de celui utilisé par les IFN- α et β . Le récepteur de l'IFN- γ est composé de deux sous-unités IFNGR1 et 2. Le gène codant pour la sous-unité IFNGR-1 est situé sur le chromosome 6, et celui codant pour la sous-unité IFNGR-2 sur le chromosome 21 chez l'homme.

La fixation de l'interféron sur son récepteur conduit à l'hétérodimérisation des sous-unités présentes à la surface des cellules : les sous-unités IFNAR-1 et -2 interagissent alors avec les IFN- α et β et les sous-unités IFNGR-1 et -2 avec l'IFN- γ .

Les IFN- λ se lient à un récepteur hétérodimérique, dans lequel une des sous-unités est un nouveau membre de la famille des récepteurs de cytokines de classe II (IFN- λ R1 ou IL-28Ra), et l'autre sous-unité est identique à la seconde chaîne du récepteur de l'IL-10 (IL-10R).

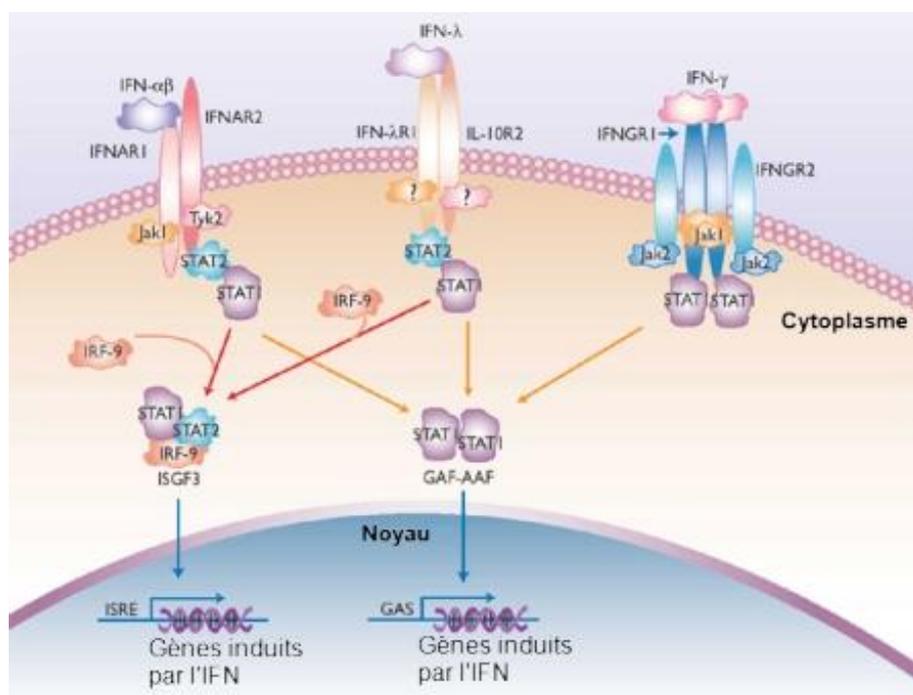


Figure 42 : Récepteurs et signaux de transduction des IFN - $\alpha/\beta,\gamma$ et λ . (Vilcek, 2003)

1.3.2 - JAKS, STATs, IRFs ET GENES INDUITS PAR LES IFN

La fixation des IFN à leurs récepteurs rapproche les domaines intracellulaires de ces récepteurs, ce qui induit l'activation de voies de signalisation impliquant la voie des protéines Jak-STAT et permet l'activation transcriptionnelle de l'expression de différents gènes cellulaires de réponse aux interférons. Les protéines de la famille STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) sont des facteurs de transcription cytoplasmiques

latents qui sont phosphorylés au niveau de résidus tyrosine par les enzymes tyrosine kinase de la famille Jak (Janus Activated Kinase). La famille des protéines STAT comprend sept membres et la famille des protéines Jak en contient quatre. Les descriptions suivantes sont illustrées par la Figure 42.

IFN- α/β

La liaison de l'IFN- α ou de l'IFN- β à leur récepteur induit la phosphorylation des kinases Jak-1 et Tyk-2 ce qui conduit ensuite à la phosphorylation et à la dimérisation des protéines STAT-1 et STAT-2 puis à leur translocation en association avec IRF-9 (p48) dans le noyau. Le complexe formé par ces trois protéines constitue l'ISGF-3 (IFN Stimulated Gene Factor 3) et active la transcription des gènes comprenant une séquence de réponse à l'IFN (ISRE).

IFN- γ

Les kinases Jak-1 et Jak-2 sont activées par l'IFN- γ ce qui conduit à la phosphorylation et à l'homodimérisation de la protéine STAT-1 puis à sa translocation dans le noyau. Le dimère de STAT-1 ou GAF (gamma activation factor) active la transcription de gènes inductibles par l'IFN- γ et comprenant une séquence de réponse à l'IFN- γ (GAS).

IFN- λ

Concernant les IFN- λ , les Jak kinases associées à leur récepteur n'ont pas été identifiées, mais Jak1 et Tyk 2 sont des candidates probables. On sait que l'activation de l'IFN- λ R conduit à l'activation à la fois de STAT1 et STAT2 et permet la formation d'ISGF3 ainsi que de GAF. Les signaux induits par l'IFN- λ sont donc identiques à ceux induits par les IFN de type I. Mais l'IFN- λ permet aussi l'activation de STAT3 et STAT5, ce qui est plus proche des signaux induits par l'IL-10 (Kotenko *et al.*, 2003).

D'autres voies de signalisation sont également activées par le récepteur aux IFN de type I. La voie de la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase), impliquée en amont de multiples cascades de signalisation, est une des voies les mieux documentées. L'activation des récepteurs aux IFN est un phénomène transitoire, la voie Jak/STAT étant régulée négativement par différents mécanismes.

1.3.3 - ACTIVITE ANTIVIRALE DES INTERFERONS

La réplication d'un grand nombre de virus à ADN et à ARN est inhibée par les interférons, à la fois *in vitro* en culture cellulaire et *in vivo*. Pour la plupart des virus sensibles à l'activité antivirale des interférons en culture cellulaire, c'est typiquement la première étape de synthèse des polypeptides viraux qui est inhibée (Biron et Sen, 2001; Samuel, 1991) bien que des exceptions existent pour certains virus où l'IFN agit au niveau des étapes de multiplications ou avant la première traduction (Samuel, 2001). Parmi les protéines induites par l'IFN et impliquées dans l'action antivirale des cellules infectées par des virus, on trouve principalement la **PKR** (protéine kinase dépendant des ARN double-brin), la **2',5'-oligoadénylate synthétase (2',5'-OAS)**, la **Rnase L**, l'**ADAR** (adénosine deaminase spécifique des ARN) et les protéines **GTPases Mx**.

Les ARN double-brin jouent un rôle central dans la modulation de la phosphorylation des protéines, la dégradation des ARN et l'ARN *editing* (Jacobs et Langland, 1996; Samuel, 1998) ; de manière intéressante, ils servent également de matrice pour l'extinction de gènes (Bass, 2000).

L'IFN induit également une forme d'oxyde nitrique synthétase (iNOS2), ainsi que la synthèse des molécules du CMH de classe I et II, qui jouent toutes un rôle important dans la réponse immune vis à vis des infections. La description détaillée des protéines induites par les IFN est schématisée dans la Figure 43.

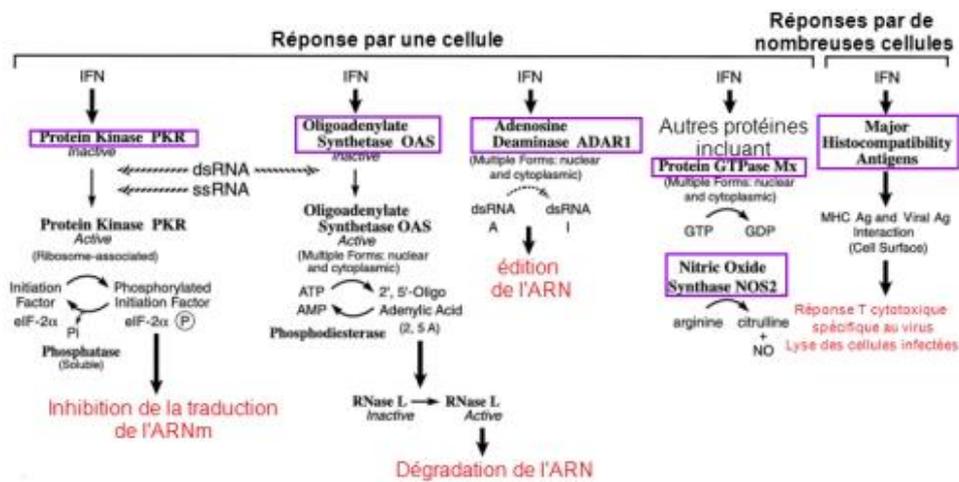


Figure 43 : Action antivirale de l'IFN. (Samuel, 2001)

LA PROTEINE KINASE DEPENDANTE DES ARN DOUBLE-BRIN (PKR)

La PKR est une protéine kinase induite par l'IFN qui est essentiellement présente dans le cytoplasme et associée aux ribosomes après traitement par l'interféron (Pestka *et al.*, 1987; Samuel, 1993; Thomis et Samuel, 1992). Elle a aussi été retrouvée en faible quantité dans le noyau par immunofluorescence (Jimenez-Garcia, 1993; Thomis et Samuel, 1992).

La fixation de séquences d'ARN double-brin au niveau d'un motif répété situé dans la région N-terminale de PKR induit la dimérisation de la protéine. La PKR est alors activée par auto-phosphorylation. Cette auto-phosphorylation se fait de façon intramoléculaire ou intermoléculaire. Les sites d'auto-phosphorylation sont essentiellement des résidus sérine, mais elle peut aussi se faire au niveau de résidus thréonine. PKR subit ensuite un changement conformationnel qui la dissocie de l'ARN double-brin initial. La PKR catalyse la phosphorylation intermoléculaire de plusieurs substrats protéiques dont la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la synthèse protéique (eIF2 α) et le facteur inhibiteur de la transcription I κ B

Le facteur eIF2 est le substrat de PKR le mieux caractérisé aussi bien au niveau structural que fonctionnel. La phosphorylation de eIF2 α catalysée par la PKR conduit à l'inhibition de la traduction cellulaire et virale.

Concernant le VHC, les données obtenues sur les réplicons sont controversées. La surexpression de la protéine E3L, qui séquestre les ARN double-brin et empêche l'activation de PKR et de la voie 2',5'-oligoadénylate synthétase et RnaseL, n'empêche pas l'inhibition de la réplication du VHC par l'IFN- α . De plus, l'inhibition de PKR par la 2-aminopurine (2-AP) et l'ARN-VA (ARN viral-associé) d'adénovirus ne bloquent pas la réponse de l'IFN- α contre le VHC. Deux petits ARN-VA d'adénovirus sont transcrits en fin du cycle de multiplication des adénovirus, leurs produits de transcription, protégeant les cellules infectées de la lyse par l'interféron. Ces résultats suggèrent que les voies antivirales dépendantes des ARN double-brin comme la PKR et la Rnase L, ne seraient pas impliquées dans l'inhibition de la réplication du VHC induite par l'IFN- α dans les cellules Huh-7 (Guo *et al.*, 2003b). Dans une autre étude, le taux de réplication du réplicon VHC est augmentée par l'ARN-VA d'adénovirus, que les cellules Huh-7 soient traitées ou non par l'IFN- α . Par conséquent, ceci suggère que PKR, lorsqu'elle n'est pas inhibée, serait bien impliquée dans l'inhibition de la réplication de l'ARN du VHC (Taylor *et al.*, 2004).

LA 2',5'-OLIGOADENYLATE SYNTHETASE ET LA RNASE L

La 2',5'-oligoadénylate synthétase (2',5'-OAS) catalyse la synthèse d'oligoadénylates dont la structure générale est de la forme ppp(A2'p) $_n$ A, couramment abrégés 2'-5'A, qui possèdent un pont phosphodiester 2',5'. La Rnase L est une endoribonucléase latente, capable de digérer de manière aléatoire les ARN simple-brin, et activée par la liaison des oligonucléotides 2'-5'A. Les ponts phosphodiester 2',5' peuvent être hydrolysés par une phosphodiesterase, ce qui atténue l'action de la 2',5'-OAS

L'ADENOSINE DESAMINASE SPECIFIQUE DE L'ARN (ADAR1)

Les modifications post-traductionnelles de l'ARN comme la désamination d'adénosine pour produire de l'inosine est un mécanisme important par lequel l'activité fonctionnelle des ARN viraux et cellulaires peut être altéré. L'ADAR1 est une adénosine désaminase spécifique de l'ARN induite par l'IFN. L'ADAR1 induit des transitions d'adénosine en inosine qui déstabilisent l'hélice d'ARN double-brin, les paires AU stables étant changées en paires IU beaucoup moins stables (SAMUEL, 2001).

L'ARN-VA d'adénovirus, capable d'inhiber la PKR et ADAR1 est capable de stimuler la traduction dans des cellules contenant des réplicons du VHC, conférant ainsi une résistance à l'effet inhibiteur induit par l'IFN- α . En outre, l'addition de siRNA spécifique de ADAR1 augmente le taux de réplicon de 40 fois, indiquant que ADAR1 a bien un rôle dans la limitation de la réplication de l'ARN du VHC dans le système des réplicons (Taylor *et al.*, 2004).

LA PROTEINE GTPASE Mx

Les protéines Mx sont probablement les produits de gènes inductibles par l'IFN ayant une activité antivirale, les mieux caractérisés. Les protéines Mx sont des GTPases qui appartiennent à la superfamille des GTPases ressemblant à la dynamine. Le motif de liaison au GTP très conservé se situe au sein de la région N-terminale. Les protéines Mx s'associent entre elles et de façon importante avec les complexes de protéines virales. Les régions centrale et C-terminale des Mx jouent des rôles importants dans ces interactions protéines-protéines. Les protéines Mx sont inductibles par les IFN- α et β , mais pas par l'IFN- γ . Certaines protéines Mx, notamment la protéine MxA, possèdent une activité antivirale intrinsèque. Le spectre d'activité antivirale intrinsèque des protéines Mx et le mécanisme moléculaire permettant d'inhiber la réplication virale dépendent spécifiquement de la protéine Mx, de sa localisation sub-cellulaire et du virus examiné.

Le génome humain code pour les protéines MxA et MxB, qui sont induites par les IFN- α et β . La protéine MxA possède une activité antivirale mais pas MxB. L'activité antivirale de MxA nécessite une oligomérisation qui dépend de la liaison de GTP et de son hydrolyse. Les cellules exprimant MxA de façon constitutive présentent une activité antivirale vis à vis d'*Orthomyxoviridae* (virus *influenza A* et C), de *Bunyaviridae* (virus LaCrosse, *Hantavirus*), *Paramyxoviridae* (virus de la rougeole, virus *parainfluenza*), *Rhabdoviridae* (VSV), *Togaviridae* (virus de la forêt de Semliki). Par contre MxA n'inhibe pas la multiplication de certains *Picornaviridae* (virus de l'encéphalomyocardite, virus Mengo).

L'expression de mutants dominants négatifs pour MxA en présence d'IFN- α n'a aucun effet sur la réplication, suggérant que cet effecteur n'est pas impliqué dans l'action anti-VHC de cette cytokine (Frese *et al.*, 2001)

1.3.4 - REGULATION DE LA REPONSE DE L'HOTE PAR LE VIRUS

Les sites clés de la réponse de l'hôte pour contrôler le VHC se situent au niveau des voies de reconnaissance du signal viral (voir p. 63), au niveau des voies de signalisation *via* les récepteurs de l'IFN- α/β qui aboutissent à l'expression des ISG et au niveau des protéines effectrices issues des ISG (Figure 44).

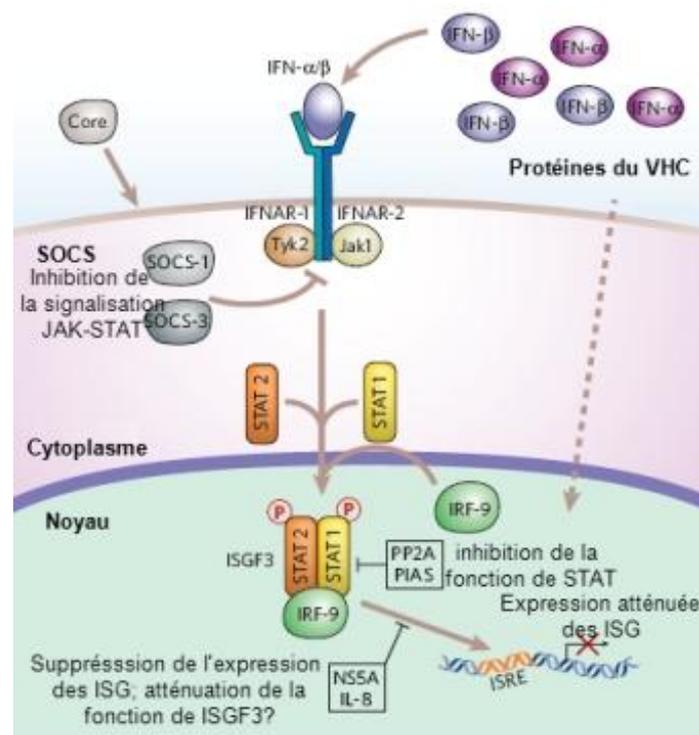


Figure 44 : Le VHC atténue les signalisations *via* l'IFN *via* de multiples mécanismes. (Gale et Foy, 2005)

REGULATION DU SIGNAL INDUIT PAR LES IFN- α ET β

Les taux élevés de protéine phosphatase A2 au sein du tissu hépatique, induiraient une hypométhylation et une inactivation de STAT1.

La protéine de capsid a été associée à des taux élevés d'expression du suppresseur de signal de cytokine-3 (SOCS, suppressor of cytokine signalling) en culture cellulaire. Les protéines SOCS sont des régulateurs négatifs et des inhibiteurs de la voie Jak-STAT.

REGULATION DE L'EXPRESSION OU DE LA FONCTION DES ISGs

L'expression de NS5A confère une atténuation générale de l'expression des ISGs. NS5A peut induire l'expression et la sécrétion d'IL-8, chimiokine proinflammatoire dont les actions interfèrent avec celles de l'IFN.

Comme détaillé précédemment, NS5A et E2 sont des inhibiteurs de PKR. Cette inhibition permettrait au VHC d'échapper en partie aux actions suppressives de la traduction. Cependant, cette inhibition n'est pas universelle et varie en fonction de variations génétiques virales.

Enfin, la RNase L a des sites préférentiels de clivage précis sur l'ARN du VHC, ces sites étant moins nombreux sur les séquences d'ARN de VHC de génotype 1 par rapport au génotype 2 ou 3. Ceci permettrait d'expliquer en partie la plus grande résistance du génotype 1 à l'action de l'IFN.

VARIATION GENETIQUE VIRALE ET REPONSE DE L'HOTE A L'INFECTION

La résolution d'une infection aiguë par le VHC est associée à une réduction globale de la complexité des quasi-espèces virales au sein des régions codant pour E1 et E2, tandis que la progression vers la chronicité et la résistance au traitement par IFN est associée à une augmentation de la complexité génétique virale. La pression immunitaire de l'hôte conduit à l'émergence ou à la sélection de variants d'échappement viral capables de persister et de résister à l'action de l'IFN (Farci et Purcell, 2000; Farci *et al.*, 2002; Pawlotsky, 1999).

L'analyse des séquences codant pour NS5A a permis d'identifier des domaines spécifiques dont les séquences varient en association avec l'issue du traitement par IFN. Parmi ces domaines, l'ISDR (*interferon sensitivity*

determining region), région de 40 acides aminés qui fait partie du domaine de liaison à la PKR de NS5A, a été très étudiée. Dans l'étude japonaise initiale, tous les génotypes 1b présentant au moins 4 mutations au sein de l'ISDR par rapport à la séquence de la souche HCV-J prototype étaient associés à une réponse prolongée au traitement (Enomoto *et al.*, 1995; Enomoto *et al.*, 1996). Cette association a cependant été controversée, notamment en raison de sa variabilité selon les populations de patients étudiées. Aucune séquence NS5A ne paraît intrinsèquement sensible ou résistante à l'IFN- α , cependant la quasiespèce HCV-J est significativement plus fréquente dans les quasiespèces des patients non répondeurs par rapport aux patients répondeurs (Pawlotsky *et al.*, 1998). Des méta-analyses récentes après un long suivi ont permis de conclure que les variations de séquence de NS5A, au sein de la région ISDR de 40 résidus, sont associées à l'issue du traitement par IFN. Cette région de NS5A englobe un domaine génétiquement flexible, site clé d'adaptations qui influencent la réplication de l'ARN (Appel *et al.*, 2004; Schinkel *et al.*, 2004).

La région V3 située à l'extrémité carboxy-terminale de NS5A paraît également associée à des différences dans la réponse à l'IFN- α , la sélection de souches ayant une meilleure adaptation paraissant jouer un rôle dans l'acquisition de virus résistant chez certains patients (Vuillermoz *et al.*, 2004).

1.4 - IMMUNOMODULATION

En plus de son action antivirale directe, l'IFN a des interactions importantes avec les réponses immunitaires adaptatives et innées. Les IFN de type 1 favorisent la prolifération des lymphocytes T mémoire, empêchent l'apoptose des lymphocytes T et stimulent l'activation des cellules NK et la maturation des cellules dendritiques. L'IFN augmente aussi la production des peptides du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II, et favorise le développement de lymphocytes Th1 par rapport aux lymphocytes Th2 (Feld et Hoofnagle, 2005).

Les études des cinétiques virales au cours des traitements antiviraux, basées sur des mesures fréquentes de la charge virale et des modèles mathématiques, ont permis d'élaborer des hypothèses sur le mécanisme d'action des drogues antivirales dans l'hépatite C chronique. Au cours du traitement par l'IFN- α standard, les taux d'ARN du VHC diminuent selon une courbe biphasique (Figure 45)

La première phase se caractérise par une phase rapide de suppression virale liée à l'inhibition de la réplication virale par l'action antivirale non spécifique directe de l'IFN- α . L'inhibition directe de la réplication du VHC a été confirmée dans le modèle des réplicons du VHC et en culture primaire d'hépatocytes humains normaux. Les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans cette inhibition font toujours l'objet d'études, détaillées précédemment.

La deuxième phase de suppression virale est plus lente et correspond à la clairance progressive des hépatocytes infectés, grâce au système immunitaire du patient, tandis que la réplication du VHC est inhibée par l'IFN- α (Neumann, 1998; Pawlotsky, 2003).

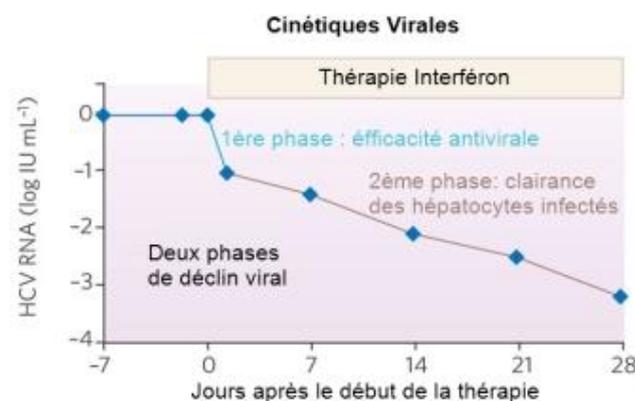


Figure 45 : Modèle de diminution des niveaux d'ARN VHC au cours de la thérapie de l'hépatite C chronique. (Feld et Hoofnagle, 2005).

2 - LA RIBAVIRINE

2.1 - GENERALITES

La ribavirine (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), un analogue de la guanosine (Figure 46) a été découverte en 1972 par ICN Pharmaceuticals (Sidwell *et al.*, 1972). La ribavirine exerce une activité antivirale à large spectre contre des virus à ADN et à ARN (Fernandez-Larsson et Patterson, 1990). Chez l'homme, outre son utilisation combinée à l'IFN-α pour le traitement de l'hépatite C, la ribavirine est utilisée en monothérapie dans les infections par le virus de la fièvre de Lassa (McCormick *et al.*, 1986) et dans les infections sévères à virus respiratoire syncytial (Hall *et al.*, 1983).

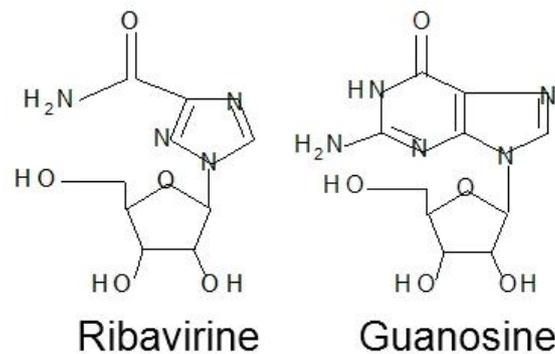


Figure 46 : Structures chimiques de la ribavirine et de la guanosine

2.2 - ACTIONS DE LA RIBAVIRINE

L'action antivirale de la ribavirine est complexe et demeure controversée. A ce jour, quatre mécanismes principaux d'action ont été proposés et sont résumés dans la Figure 47.

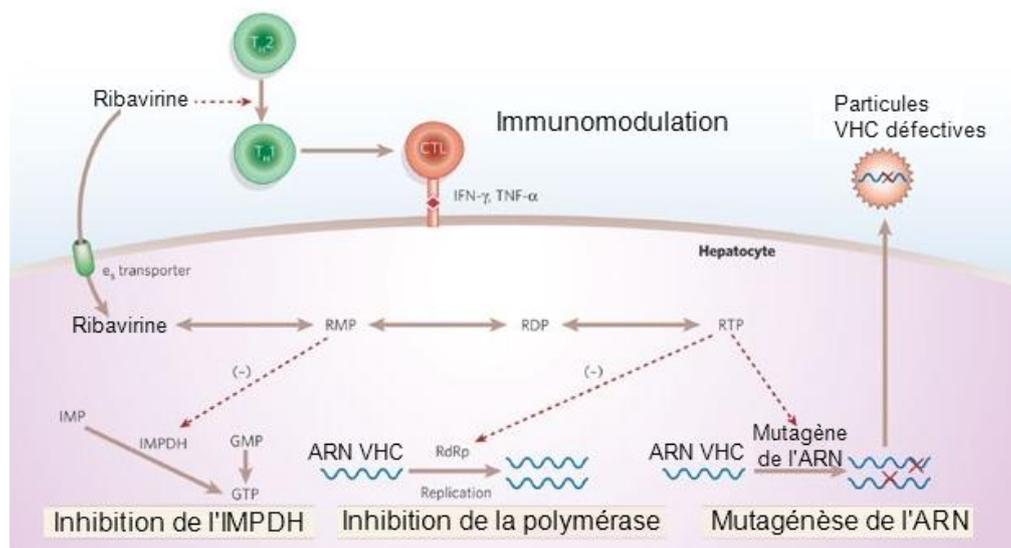


Figure 47 : Mécanismes d'action proposés de la ribavirine dans l'infection VHC. (Feld et Hoofnagle, 2005)

2.2.1 - UNE ACTION IMMUNOMODULATRICE

L'équilibre entre les réponses CD4⁺ Th1 et Th2 est important pour l'évolution de l'infection VHC. Plusieurs études suggèrent qu'une réponse immune primaire Th1 permet une élimination virale alors qu'une réponse Th2 favorise une évolution chronique (Rehermann et Nascimbeni, 2005). Il a été montré que la ribavirine modifie l'équilibre Th1/Th2 en faveur de Th1, ce qui pourrait potentiellement améliorer le traitement contre le VHC. *In vitro* et dans des concentrations cliniquement cohérentes, la ribavirine augmente la production de cytokines Th1 produites par les lymphocytes T stimulés et inhibe celle de Th2 (Tam *et al.*, 1999). Enfin, les patients traités avec la combinaison IFN-α

et ribavirine présentent des réponses T spécifiques au VHC plus fortes que ceux traités par l'IFN- α seul, résultats en accord avec le taux de RVS (Cramp *et al.*, 2000).

La ribavirine aurait donc la capacité de moduler le système immunitaire mais son mode d'action précis reste à éclaircir. Ce qui est certain c'est que ce mode ne permet pas d'expliquer l'activité antivirale fondamentale de la ribavirine qui présente une activité puissante contre de nombreux virus à ARN en culture cellulaire, modèles où l'immunomodulation est impossible.

2.2.2 - ACTION DE LA RIBAVIRINE SUR L'IMPDH.

La ribavirine sous forme monophosphate est un inhibiteur compétitif de l'IMPDH (Inosine Monophosphate Déshydrogénase), créant alors au niveau intracellulaire une déplétion en GTP, nécessaire à la synthèse de l'ARN viral. Dans le système réplicon, la ribavirine et d'autres inhibiteurs de l'IMPDH (acide mycophénolique et VX-497) inhibent en partie la réplication. L'addition d'un excès de guanosine abolit l'activité de l'acide mycophénolique et de VX-497 mais n'inverse que partiellement l'action de la ribavirine (Lau *et al.*, 2002). Ces résultats sont en accord avec les effets minimaux de la ribavirine administrée en monothérapie sur les niveaux sériques en ARN du VHC et indique que l'inhibition de l'IMPDH et la déplétion en GTP pourrait contribuer à l'effet de la ribavirine mais ne serait pas son déterminant principal.

2.2.3 - LA RIBAVIRINE, INHIBITEUR DIRECT DE LA REPLICATION DU VHC.

En tant qu'analogue de la guanosine, la ribavirine est phosphorylée dans la cellule pour former le ribavirine monophosphate (RMP), diphosphate (RDP) et triphosphate (RTP). L'incorporation de RTP par la polymérase pourrait entraîner une terminaison de chaîne précoce et une inhibition de la réplication. En effet, il a été montré que la RTP était un inhibiteur faible de plusieurs polymérases virales, notamment celle du virus de la diarrhée bovine, un virus proche du VHC (Lau *et al.*, 2002). En utilisant un test de l'ARN polymérase ARN dépendante du VHC, il a été montré que la RTP était incorporée dans les chaînes d'ARN viral naissantes en regard d'une cytosine ou d'une uridine, bloquant ainsi significativement l'élongation de l'ARN (Maag *et al.*, 2001). Cet effet inhibiteur est présent pour les polymérases issues des six géotypes mais nécessite des concentrations assez élevées (50-150 μ M), ce qui est beaucoup plus que les concentrations utilisées en clinique (10 μ M).

Même si la ribavirine peut avoir un effet sur la réplication de l'ARN du VHC, il semble que cela ne soit pas non plus la mode d'action majeur de l'inhibition observée contre l'hépatite C.

2.2.4 - LA RIBAVIRINE, AGENT MUTAGÈNE DE L'ARN.

Un modèle a été établi dans lequel la ribavirine agirait comme un mutagène viral, causant une fréquence plus importante de mutations et poussant le virus au-delà du seuil «d'erreur catastrophe», en relation avec les données obtenues sur le poliovirus (Crotty *et al.*, 2001; Crotty *et al.*, 2000). Plusieurs données *in vitro* et *in vivo* confirment ce modèle qui expliquerait l'effet de la ribavirine contre le VHC. Dans le système réplicon, bien que la ribavirine ait peu d'effet sur les niveaux de réplication du VHC, elle réduit de manière significative l'efficacité des nouvelles générations lors de la transfection de nouvelles cellules (Lanford *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003), un reflet indirect de la réduction de la qualité (à opposer à la quantité) de virus. Ces observations ont été confirmées dans un système de réplicon complet (Contreras *et al.*, 2002) et dans le modèle réplicon (Escuret *et al.*, 2002) avec une fréquence de mutation importante dans NS5A et dans le modèle du GB Virus-B (Lanford *et al.*, 2001). Cependant, chez l'homme, dans le cas de patients recevant une monothérapie à la ribavirine, les études ont montré peu (Young *et al.*, 2003) ou pas d'augmentation du nombre de mutations dans l'ARN du VHC circulant (Dixit *et al.*, 2004; Pawlitsky *et al.*, 2004).

Il reste pourtant envisageable que ces études ne soient pas optimales pour identifier l'augmentation des mutations. Des études de cinétique virale comparant l'IFN- α seul avec sa combinaison avec la ribavirine confirment cette

hypothèse. Il semblerait que la ribavirine n'agisse pas sur la première phase de diminution mais sur la deuxième phase (voir Figure 45) par augmentation des mutations du VHC. Au final, il en résulterait une diminution du taux d'hépatocytes infectés de manière productive, i.e. par un virus capable de se répliquer (Dixit *et al.*, 2004; Layden-Almer *et al.*, 2003).

Cette dernière hypothèse est la plus intéressante pour expliquer les effets de la ribavirine dans la thérapie contre le virus de l'hépatite C. En **diminuant la dynamique répllicative** et en **resserrant la diversité génétique** du VHC, la ribavirine réduirait la capacité du virus à échapper à la pression immunitaire et antivirale, augmentant ainsi l'efficacité de l'IFN.

3 - DONNEES CLINIQUE DE LA BITHERAPIE

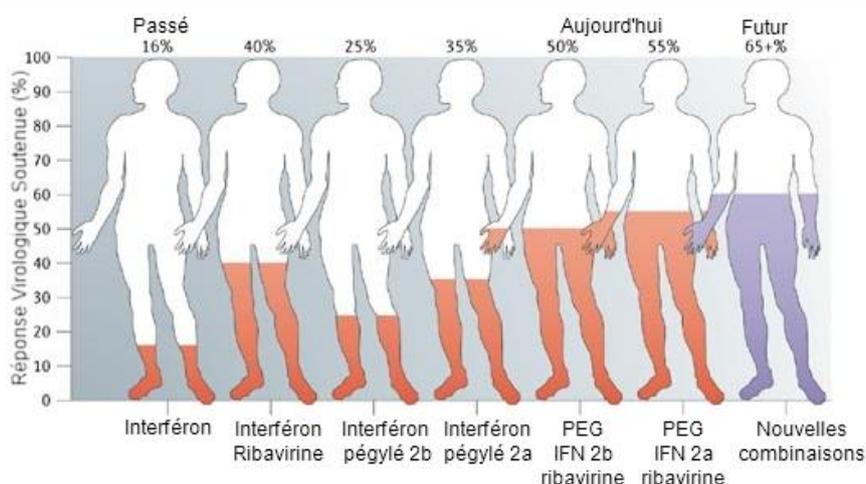


Figure 48 : Évolution du taux de réponse virologique soutenue (RVS) avec les traitements contre l'hépatite C. (Smith, 2006).

Comme illustré dans la Figure 48, on observe depuis plusieurs années une évolution régulière du taux de réponse virologique soutenue (RVS) au traitement. La combinaison PEG-IFN et ribavirine a permis d'obtenir aujourd'hui entre **50 et 55% de RVS**. Ce chiffre masque en réalité de grandes variations entre les génotypes puisque dans le cas de patients infectés par un **génotype 2 ou 3, on observe 80% de RVS** mais seulement **50% de RVS pour les patients infectés par le génotype 1**, génotype responsable de 70% des infections en Amérique du Nord et en Europe (Zeuzem, 2004). Le génotype 4, retrouvé principalement au Moyen Orient semble présenter les mêmes profils de réponse que le génotype 1 avec un taux de RVS de l'ordre de 40% (Koshy *et al.*, 2002). De nouvelles approches sont donc nécessaires pour améliorer les taux de réponse.

B - PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

Longtemps freinées par l'absence de modèles, les recherches sur le VHC ont connu ces dernières années des avancées significatives. La mise au point du système réplicon a permis le développement d'inhibiteurs variés notamment contre les enzymes virales (Bartenschlager, 2002). Le système des pseudo-particules a permis de réaliser des avancées importantes vers la mise au point d'un vaccin et la compréhension de l'entrée du virus. Gageons que l'apparition du système de réplication complet du VHC permettra de mieux connaître le virus et de conforter certaines perspectives thérapeutiques.

En plus de l'amélioration de la bithérapie actuelle et des études sur l'immunomodulation, plusieurs nouvelles cibles peuvent être dorénavant raisonnablement envisagées et sont résumées dans la Figure 49.

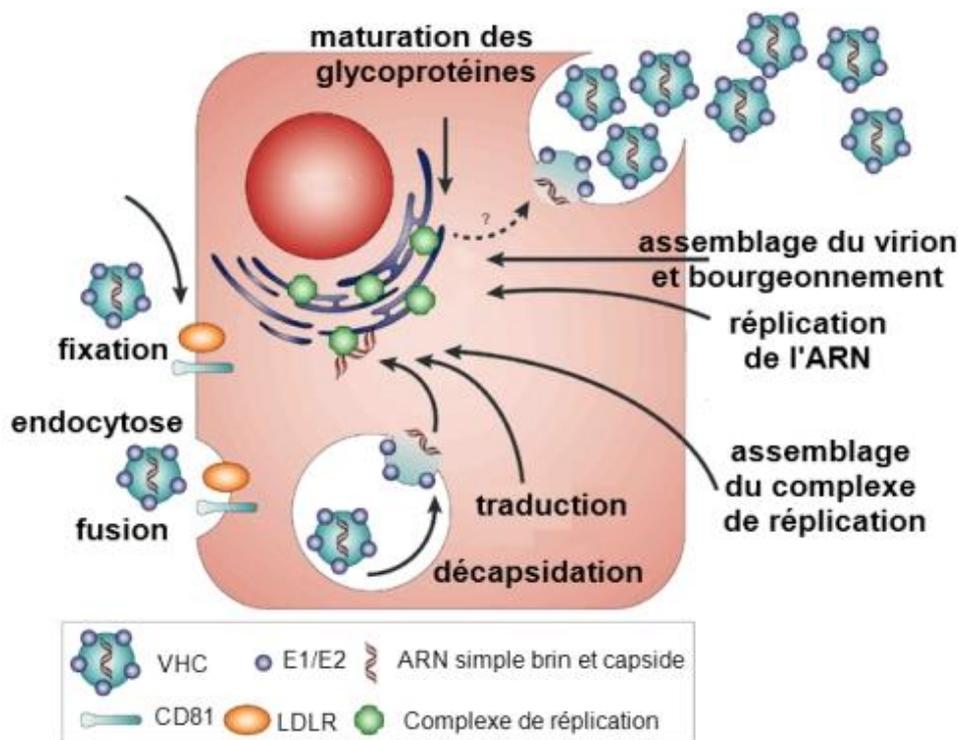


Figure 49 : Cibles envisageables dans le développement d'antiviraux. (Tan *et al.*, 2002)

Dans le détail, plusieurs étapes dans le cycle du VHC pourraient être la cible d'antiviraux: la **fixation** (inhibiteurs des récepteurs); l'**endocytose** ; la **fusion du virion** à la membrane; la **décapsidation**; la **traduction** (inhibiteurs de l'IRES, oligomères antisens, ribozymes, siRNA); l'**assemblage** du complexe de réplication (inhibiteurs de protéases NS2-NS3 ou NS3-4A); la **réplication** de l'ARN (inhibiteurs de la polymérase NS5B et de l'hélicase NS3); l'**assemblage** du virion et le bourgeonnement du RE (inhibiteurs de p7); le transport vésiculaire et la **maturation** de la glycoprotéine; la **fusion des vésicules** et le relargage du virion. Le développement d'un vaccin thérapeutique est également sérieusement envisagé.

Ne pouvant être exhaustif, j'ai choisi de me focaliser sur les travaux les plus avancés en clinique en détaillant les **améliorations de la bithérapie actuelle** en approfondissant en particulier les études sur les interférons (dans lesquels s'inscrit notre étude 1), en présentant les **approches dirigées contre les enzymes virales** et en donnant quelques informations dans la **perspective vaccinale**. Dans la partie suivante, je traiterai des autres approches, dont l'**approche antisens**, utilisée dans nos études 2 & 3.

1 - AMELIORATION DE LA BITHÉRAPIE ACTUELLE

La bithérapie actuelle n'est pas satisfaisante, à la fois si l'on considère **les taux de réponse (RVS)** mais également en tenant compte des **effets secondaires des molécules utilisées**. L'apparition des **interférons pégylés**, i.e. permettant d'augmenter la demi-vie de la molécule, a permis d'améliorer les taux de RVS mais pas de diminuer les effets secondaires liés au traitement. La ribavirine est également à l'origine d'effets secondaires importants, ce qui au final, conduit à l'arrêt du traitement dans un nombre non négligeable de cas. Des améliorations de la bithérapie sont donc nécessaires.

1.1 - NOUVEAUX INTERFERONS

Une première possibilité est d'essayer d'améliorer les interférons. Trois directions principales ont été explorées dans ce sens : le travail sur un **interféron consensus** (Alfacon-1 ou CIFN), un **interféron albumine** (IFN-alb) et des études basées sur des **recombinaisons dans les gènes codant l'interféron** (Maxygen – Roche). L'objectif de toutes les recherches est de trouver un dérivé qui permette une diminution des doses d'interféron administrées au patient sans impact sur l'efficacité du traitement, l'interféron ayant de nombreux effets indésirables (un syndrome pseudo-grippal accompagné d'une dépression essentiellement) et étant responsable de la majorité des arrêts du traitement.

L'INTERFERON ALFACON-1 OU INFERGEN™

C'est un interféron **consensus** de 13 gènes codant des interférons alpha sauvages ($\approx 88\%$ identiques aux interférons alpha 2a/2b) et qui présente une augmentation *in vitro* de l'activité antivirale. Au niveau clinique, il permet d'améliorer le taux de RVS global (57%) contre seulement 40% pour l'IFN alpha 2b seul (Sjogren *et al.*, 2005). Il est mieux toléré et présente un profil d'immunogénicité acceptable. D'autres données montrent qu'en combinaison avec la ribavirine, il permet d'atteindre un taux de non répondeurs de 22% chez des patients infectés par un VHC de type 1 mais il n'a pas d'effet sur la prise du traitement (Cornberg *et al.*, 2006). Déjà autorisé aux USA depuis 2002 et préconisé pour les patients difficiles à traiter, il n'est plus autorisé en Europe depuis mai 2006 à la demande du laboratoire pour des raisons commerciales.

L'INTERFERON ALBUMINE OU ALBUFERON™

C'est un interféron **albumine** qui combine les propriétés thérapeutiques de l'interféron couplé à la longue demi-vie de l'albumine dans le sérum (Figure 50). Les études cliniques de phase 1 et 2 ont montré que ce dérivé induisait des effets biologiques similaires aux interférons recombinants disponibles pour le traitement. Il active les mêmes 31 gènes comparé à l'interféron alpha et ce d'une manière dose dépendante, induisant les mêmes cascades d'expression de gènes (Balan, 2003 ; Moore et Balan, 2005). La molécule est par contre mieux tolérée par les patients et persiste dans le sang plus longtemps que les interférons alpha et alpha-pégylés (Bain *et al.*, 2006). Une étude clinique de phase 3 va être lancée avant très prochainement en vue de la commercialisation de la molécule en collaboration avec Novartis (HGS, 2006).

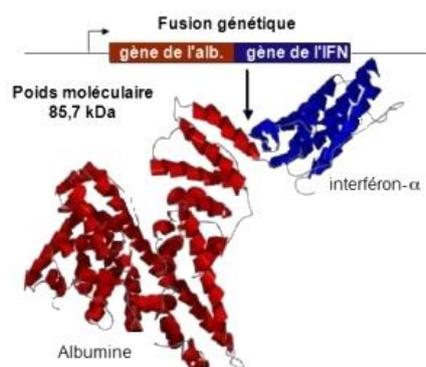


Figure 50 : L'albuféron est un polypeptide unique qui combine l'albumine et l'interféron. HGS (Human Genome Science) & Novartis.

NOUVEAUX INTERFERONS PAR « BRASSAGE D'ADN »

Une dernière approche prometteuse, développée par Maxygen / Roche, dite « d'évolution dirigée » ou « culture moléculaire » des gènes d'interférons permet d'augmenter par permutations la diversité naturelle (Harayama, 1998; Patten *et al.*, 1997). Cette méthode permet de faire évoluer rapidement les gènes d'opérons ou de virus entiers pour l'acquisition d'une propriété recherchée par des cycles de générations aléatoires puis de sélections résumés dans la Figure 51. Elle a par exemple été utilisée pour générer de nouveaux rétrovirus aux tropismes altérés (Pekrun *et al.*, 2002) mais aussi pour générer de nouvelles cytokines. La génération aléatoire d'une famille de plus de 20 gènes codant l'interféron alpha a été utilisée pour générer des **variants aux activités antivirales et antiprolifératives augmentées** en cellules de souris (Chang *et al.*, 1999). Dans cette étude il a de plus été montré que les interférons générés à partir de gènes humains étaient également réactifs en cellules murines, ce qui est tout à fait inhabituel, les interférons étant dépendant de l'espèce. Cela a été confirmé par l'analyse des mutants où sont retrouvés des sites identifiés par mutagenèse dirigés et qui permettent cette réactivité croisée (Weber *et al.*, 1987).

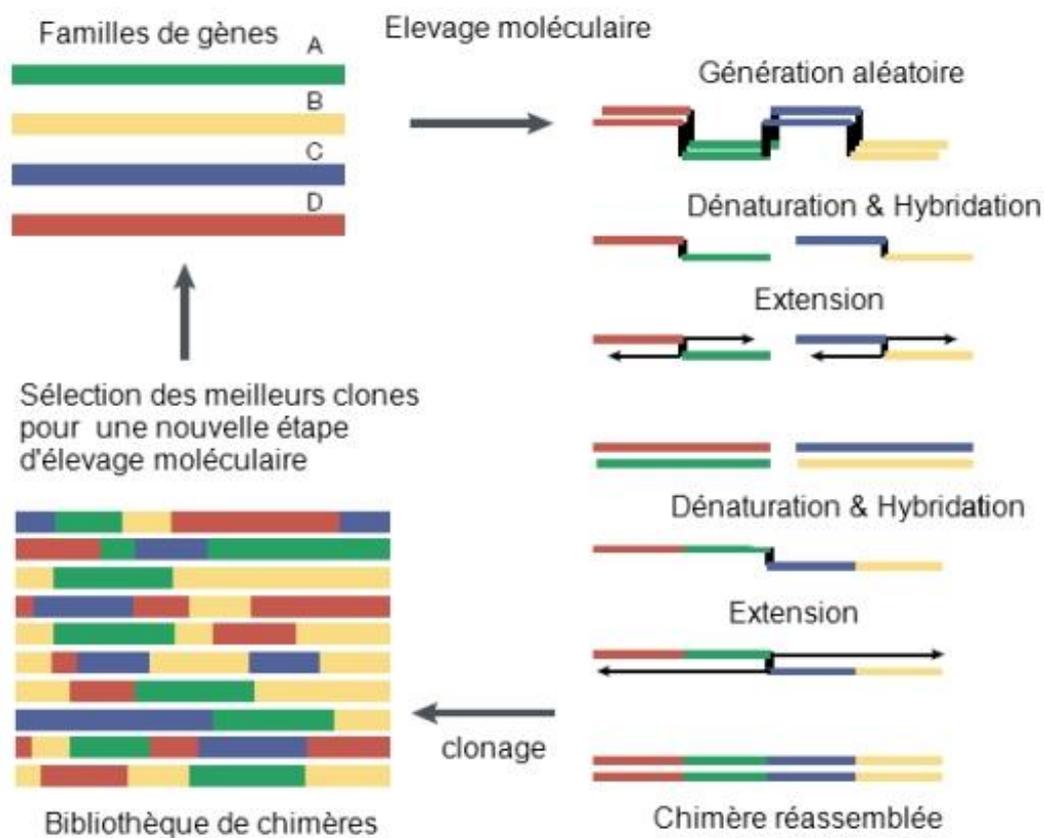


Figure 51 : Stratégie d'évolution dirigée de nouveaux gènes d'interféron alpha de Maxygen. (Katze *et al.*, 2002)

A la suite de ces observations, cette approche a été appliquée au **développement d'interférons à visée thérapeutique**, en particulier contre le VHC. Les premiers résultats ont été présentés très récemment au congrès de l'EASL (Brideau-Andersen *et al.*, 2006). Deux variants particulièrement intéressants, B9X14 et B9X25, ont été obtenus après plusieurs sélections basées sur leurs activités antivirales et sur leur potentiel d'induction d'une réponse Th1. Ils ont 85 à 89% d'homologie avec l'IFN- α sauvage. Ils ont une affinité **90 à 100 fois meilleure** pour le récepteur des IFN de type I. Au niveau de **l'activité antivirale**, elle est au moins **10 fois supérieure** à celle obtenue avec l'IFN Alfacon-1 décrit plus haut et 25 fois supérieure à l'IFN alpha-2b et ces améliorations très significatives ont été observées dans 3 lignées cellulaires différentes. Par rapport à **l'induction des Th1**, elle est **6 à 8 fois meilleure** que celle obtenue avec l'IFN Alfacon-1 et 20 fois meilleure comparée à l'IFN- α 2a.

En résumé, cette nouvelle approche a permis *in vitro* de mettre au point une molécule capable de cibler les deux phases clés de la dynamique virale, la **phase précoce** avec une meilleure inhibition de la réplication virale et la **phase tardive** avec une meilleure induction de la réponse immunitaire capable de tuer les cellules infectées.

L'utilisation de la variabilité naturelle des IFN semble donc promise à un avenir comme j'essayerai de le montrer avec l'étude 1 que nous avons conduit. En quelques mots, nous avons essayé (en collaboration avec GenOdyssee) d'identifier dans les variants naturels des IFN- α possédant un potentiel anti-HCV accru (voir p. 115

1.2 - DERIVES DE LA RIBAVIRINE

Une piste pour améliorer le traitement actuel consiste à améliorer la ribavirine. En effet, si la ribavirine est une molécule très intéressante de part son action sur des virus à ADN ou ARN tels que le VIH, le VHC ou le SRAS, son utilisation clinique n'est pas aisée. Un facteur qui limite son application potentielle est l'anémie hémolytique qu'elle entraîne lorsque qu'elle est utilisée à hautes doses. Dans le cas du VHC, il y a une accumulation de la forme triphosphorylée (RTP) dans les globules rouges, à l'origine d'une réduction ou d'un arrêt de la thérapie. Il est donc apparu très vite nécessaire d'améliorer la distribution de la molécule vers le foie et de réduire la capture des dérivés de la ribavirine par les globules rouges, ce qui permettrait une amélioration de l'index de sélectivité.

Plusieurs composés ont été explorés dont la **viramidine** (Taribavirin™) (3-carboxamide ribavirine), une molécule qui présente les mêmes activités antivirales et immunomodulatrices que la ribavirine (Barnard, 2002) et qui a été identifiée comme une pro-drogue aux propriétés pharmacocinétiques très différentes (Lin *et al.*, 2006a).

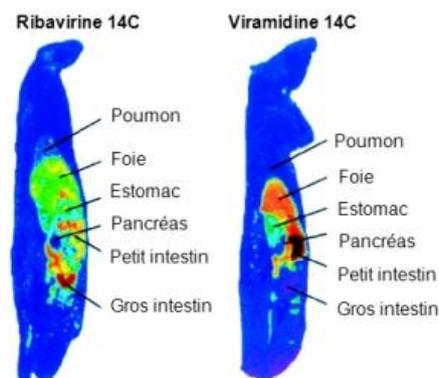


Figure 52 : Autoradiographies de rats après traitement avec de la ribavirine ou de la viramidine marquée au Carbone 14. (Wu *et al.*, 2003)

La Figure 52 présente les résultats d'une autoradiographie de rats traités par la ribavirine ou la viramidine. L'analyse montre que la viramidine est distribuée de manière préférentielle dans le foie comparé à la ribavirine et que le foie serait le lieu préférentiel de la pro-drogue (Wu *et al.*, 2003). D'autres études ont montré que chez le singe, trois fois plus de viramidine était retrouvé dans le foie comparé à la ribavirine alors qu'il y avait deux fois moins de viramidine dans les globules rouges (Lin *et al.*, 2003). Il semblerait que du fait de la similarité structurale de la viramidine avec l'adénosine, ce soit une adénosine déaminase (ADA) qui catalyse la conversion de la viramidine en ribavirine (Figure 53).

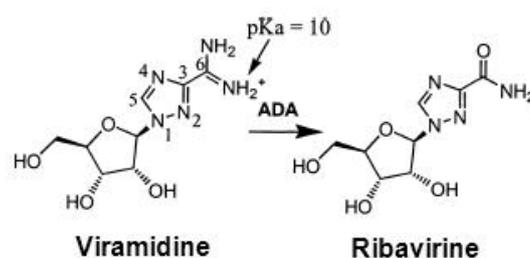


Figure 53 : Désamination de la viramidine en ribavirine par l'ADA. (Wu *et al.*, 2003)

A ce jour, les dernières données cliniques indiquent que les bénéfices de la viramidine comparé à la ribavirine en termes d'efficacité et de sécurité sont vérifiés ce qui permet de penser que des doses plus importantes pourront être administrées aux patients (Craxi, 2006).

Les résultats de la phase 3 de l'essai clinique de combinaison de l'IFN alpha 2b et viramidine présentés au 41^{ème} congrès de l'EASL sont cependant un peu décevants. Si effectivement les données concernant l'anémie sont bonnes (5% des patients vs 24%), les taux de RVS à 24 semaines (génotype 2 et 3) ou à 48 semaines (génotypes 1, 4, 5 et 6) ne sont pas satisfaisants : 52% de RVS pour la ribavirine vs 38% pour la viramidine. Il semble cependant que cela soit lié à un problème de dosage. En rapportant la dose de viramidine reçue au poids du patient, on observe que lorsque la quantité de viramidine reçue est supérieure à 23 mg/kg, les résultats sont meilleurs comparé à la ribavirine (Benhamou *et al.*, 2006). Ces résultats ayant été confirmés depuis par Valeant Pharmaceuticals, une nouvelle étude clinique (phase 2b) vient d'être lancée en tenant compte de ces observations qui ne remettent pas en cause pour l'instant le développement de la molécule et son intérêt pour les malades (Valeant-Pharmaceuticals, 2006).

2 - INHIBITEURS SPECIFIQUES DU VHC (HORS APPROCHE ANTISENS)

2.1 - INHIBITEURS DE L'ENTREE ET LA MORPHOGENESE

Actuellement, la plupart des molécules en développement sont des antiviraux dirigés contre les enzymes virales. On peut cependant raisonnablement penser qu'une stratégie antivirale basée uniquement sur l'utilisation de telles molécules rencontrera des problèmes causés par l'émergence de mutants échappatoires largement décrits pour le VIH (Condra *et al.*, 2002) et le VHB (Zoulim 2006). Dans cette optique, l'entrée du virus et sa morphogénèse peut représenter une cible intéressante et encore inexploitée. Des inhibiteurs de morphogénèse ont été récemment identifiés et étudiés dans différents systèmes. Certains d'entre eux sont en cours d'évaluation en essais cliniques. Les molécules inhibitrices sont des **immunosucres** qui ont une action sur les α -glucosidases, empêchant alors une glycosylation correcte des protéines d'enveloppes.

Pour une revue exhaustive sur le sujet, je vous recommande la lecture d'un article de synthèse par Cynthia Chapel et David Durantel du laboratoire : (Chapel *et al.*, 2006b).

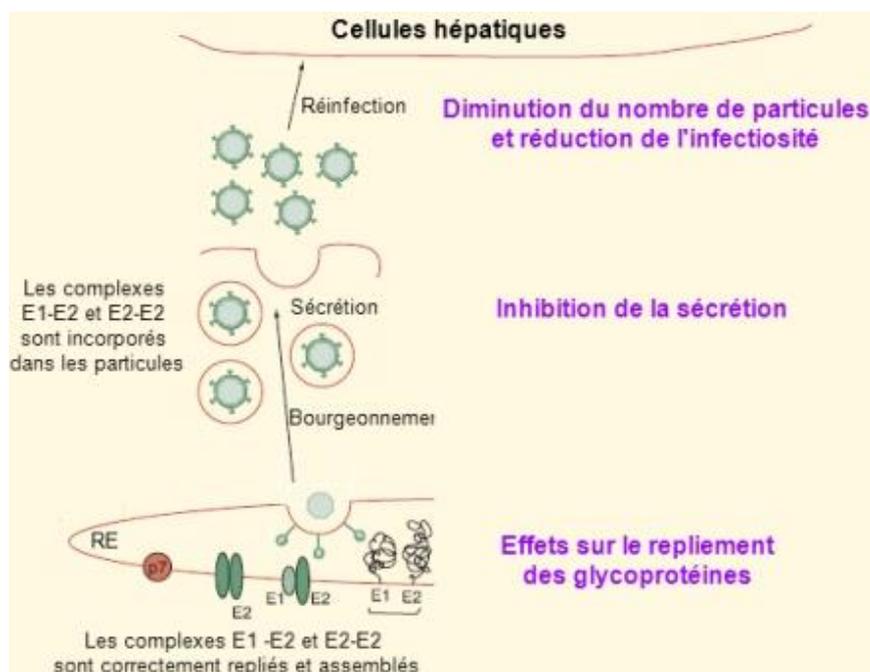


Figure 54 : Mécanismes d'action de différents immunosucres dans le modèle du BVDV. (Chapel *et al.*, 2006b)

Dans le modèle du virus de la diarrhée bovine (BVDV), il a pu être montré que deux immunosucres avaient une action sur le VHC, par inhibition des α -glucosidases, induisant des mauvais repliements et appariements des complexes glycoprotéiques. Au final ces molécules entraînent une baisse de l'infectiosité et du nombre de particules relâchées. Ces résultats ont été confirmés dans le modèle des pseudo particules virales du VHC et pourraient constituer une nouvelle approche antivirale (Chapel *et al.*, 2006a). Une utilisation contre d'autres virus utilisant des protéines fortement glycosylées serait également envisageable (fièvres Ébola, lassa, influenza A H5H1).

2.2 - INHIBITEUR DE LA PROTEASE NS3-4A

Les inhibiteurs de la protéase NS3 sont actuellement les plus développés et les plus avancés cliniquement. Les principales molécules sont présentées ci-dessous.

BILN 2061 (BOEHRINGER)

La première anti-protéase à avoir présenté des résultats intéressants était le **BILN 2061** (Lamarre, 2003). Elle a permis d'obtenir une diminution de la charge virale de 2 log après 2 jours de traitement chez des patients porteurs d'un génotype 1 (Hinrichsen *et al.*, 2004). Son efficacité est cependant plus variable chez des patients de génotypes 2 ou 3, ce qui peut s'expliquer par une affinité moindre aux polymérases de ces génotypes, probablement le « prix » à payer pour la haute efficacité observée dans les génotypes 1 (Reiser *et al.*, 2005). Son exploitation a été cependant interrompue du fait d'une toxicité cardiaque observée chez des singes rhésus. Boehringer Ingelheim poursuit l'étude du composé et des différentes possibilités de développement.

VX-950 (VERTEX)

Le **VX-950** a permis dans une étude de phase II, chez 14 patients à la dose de 750mg 3x/jour une diminution de 4 log de la charge virale. 12 patients ont atteint des niveaux indétectables d'ARN du VHC après 28 jours de traitement au VX-950, PEG-IFN et ribavirine ; la tolérance semblait bonne (Perni *et al.*, 2003). Une étude de phase II est en cours. Des études avec le système réplicon indiquent que ce composé a une excellente activité *in vitro* et que son action est synergique avec celle de l'IFN- α (Lin *et al.*, 2006b). A la différence du BILN-2061 (un inhibiteur non covalent), le VX-950 est un inhibiteur covalent et réversible de la protéase NS3-4A qui présente des mécanismes d'association et de dissociation lents, ce qui lui confère une cinétique d'inhibition différente avec une demie longue (58min) lorsqu'il est complexé (Perni *et al.*, 2006).

La Figure 55 présente la structure chimique des deux inhibiteurs et leurs sites de fixation sur une structure tridimensionnelle de la protéase NS3 (en vert) complexée avec le domaine central de NS4A (en rouge).

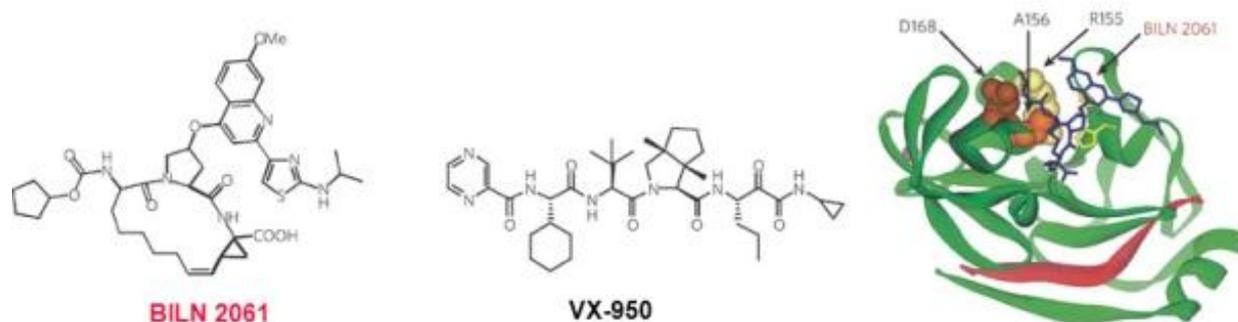


Figure 55 : Structures des inhibiteurs BILN 2061 et VX-950 de la serine protéase NS3 (en vert) complexée avec le domaine central de NS4A (en rouge). (De Francesco et Migliaccio, 2005)

SCH-503034 (SCHERING-PLOUGH)

Le développement du **SCH-503034** a été mené dans un objectif différent, se focalisant sur le traitement des non répondeurs. Dans une étude de phase II, le SCH-503034 a permis, sans problème de tolérance, une réduction de la charge virale de près de 2 log après 14 jours de traitement à la dose de 400mg 3x/jour (Zeuzem *et al.*, 2005b). Cette

même molécule a été également testée dans une étude de phase 1b en association au PegIFN-2b et a permis une réduction de près de 3log de la charge virale après 14 jours de traitement. Une étude clinique de phase II est en cours (Lin *et al.*, 2004b; Malcolm *et al.*, 2006).

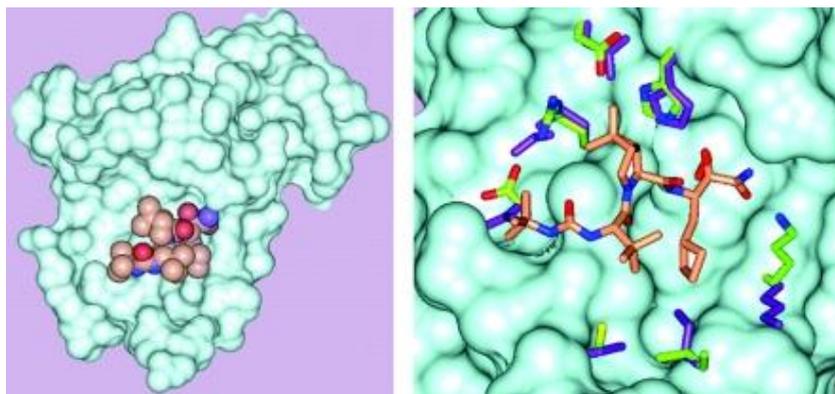


Figure 56 : Deux vues en trois dimensions du complexe protéase NS3 - SCH503034 (Malcolm *et al.*, 2006)

D'autres molécules sont en cours de développement comme l'**ITNM-191** ou le **GS-9132/ACH-806** qui seront les prochaines molécules à entrer en phase clinique.

2.3 - INHIBITEUR DE L'HELICASE/NTPASE NS3

Bien que la plupart des recherches soient focalisées sur les enzymes répliquatives du virus, l'**hélicase NS3** peut représenter une cible d'agents thérapeutiques. Elle appartient à la super famille des hélicases de type II qui fonctionnent avec **deux domaines** et se lie **perpendiculairement** à la cible en entrant en contact avec peu de résidus et de manière aspécifique. Au départ, en l'absence d'ATP, une fissure sépare les deux domaines. La liaison avec l'ATP a lieu par reconnaissance des phosphates avec des motifs connus (GSGKT et DECH). La fermeture de la fissure permet alors la translocation et l'hydrolyse de l'ATP entraîne la séparation des 2 domaines et le déroulement de l'ARN (Figure 57).

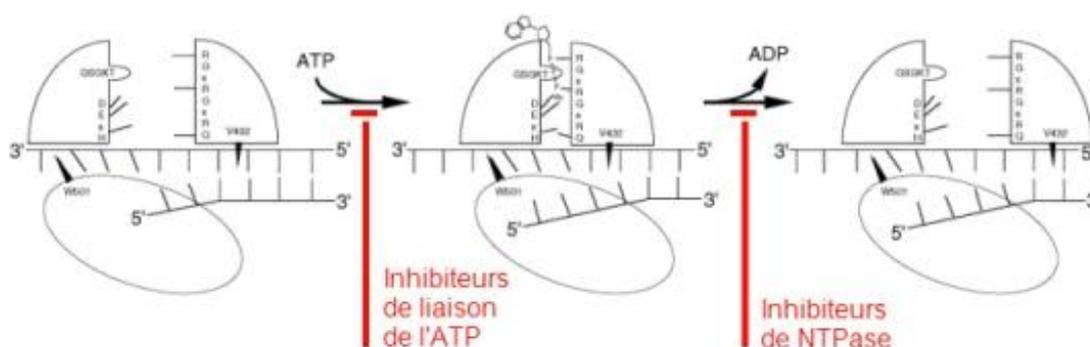


Figure 57 : Mécanisme schématique de l'hélicase. (Kim, 1998)

Il y a aujourd'hui peu d'inhibiteurs de l'hélicase. On peut distinguer les inhibiteurs qui entrent en compétition avec la liaison à l'ARN, ceux qui **empêchent la liaison de l'ATP** et enfin deux qui **inhibent l'activité NTPase** (Borowski *et al.*, 2002a; Borowski *et al.*, 2002b). ViroPharma a breveté deux séries de composés qui ont des activités de l'ordre du micro-molaire. Vertex Pharmaceuticals a identifié d'autres molécules mais avec des activités plus faibles.

2.4 - INHIBITEURS DE POLYMERASE NS5B

La majorité des antiviraux approuvés aujourd'hui inhibent les polymérase virales (De Clercq, 2001b). Ce n'est donc pas étonnant que la plupart des entreprises pharmaceutiques soient focalisées sur la mise au point d'inhibiteurs de la polymérase NS5B.

Les inhibiteurs existants peuvent être classés en **trois catégories** en fonction de leurs structures et de leurs mécanismes d'action :

- Les **analogues de nucléosides** qui doivent être phosphorylés puis incorporés par la polymérase dans les chaînes naissantes entraînant une terminaison précoce de l'élongation. Ils sont utilisés en clinique contre le VIH, le VHB et les virus de l'herpès.
- Les **inhibiteurs non analogues de nucléosides** regroupent des composés de structures variées. En général ces molécules se fixent sur l'enzyme en dehors de son site actif. Une molécule a été caractérisée contre le VIH. Elle se fixe sur un site qui n'existe qu'une fois la polymérase liée à son ligand, rendant la transcriptase reverse inapte à fonctionner.
- Les **pyrophosphates « mimiques »**, dérivés di-céto-acides et des acides carboxyliques dihydropyrimidine, sont des agents supposés interagir directement avec le site de liaison des pyrophosphates dans les polymérases virales.

Plusieurs molécules sont en essais cliniques, à des stades d'avancement variables. Les principales molécules sont présentées ci-dessous.

ANALOGUES DE NUCLEOSIDES

La **Valopicitabine™** (NM-238 -Idenix/Novartis) est en cours d'évaluation dans une étude de phase IIb chez 190 patients infectés par un VHC de génotype 1 et non répondeurs à un premier traitement par PegIFN et ribavirine. Les résultats intermédiaires à 3 mois montrent que 71% de patients présentent une baisse de 2 log de la charge virale pour une prise de 400mg à 800mg par jour pendant 7 jours puis du PegIFN-2a à la dose de 180µg par semaine (O'Brien *et al.*, 2005). Ces résultats sont très encourageants dans l'objectif de traiter des patients pour lesquels les thérapies ont échouées même si des effets secondaires gastro-intestinaux ont conduit à diminuer les doses (San Francisco *et al.*, 2006). Une étude de phase III devrait être lancée une fois étudiées les interactions éventuelles avec la ribavirine dans l'objectif de réaliser des combinaisons avec le PEG-IFN et la ribavirine (Smith, 2006).

D'autres analogues de nucléosides sont en développement. On peut citer la molécule de Roche, le **R1626**. Les résultats intérimaires de la phase clinique I indiquent que la molécule est efficace et bien tolérée (Faq et Zone, 2006). Des essais de combinaisons de phase II avec le PEG-IFN et la ribavirine sont prévus. Merk a également présenté des résultats de **2'C methyl nucléosides analogues** chez le chimpanzé ou une baisse supérieure à 4log à été observée (Ludmerer *et al.*, 2004).

INHIBITEURS NON NUCLEOSIDIQUES

Parmi les inhibiteurs non nucléosidiques (NNI), trois classes de composés sont en évaluation clinique. Les trois grandes classes sont les dérivés des **benzimidazoles**, les **benzothiadiazines** et les **thiophènes**. Pour une revue complète sur les structures chimiques des composés, voir cette revue : (De Francesco *et al.*, 2003). Peu de données sont pour l'instant disponibles concernant ces composés.

Les premières molécules à entrer en essais cliniques sont les molécules de Japan Tobacco, **JTK-003** et **JTK-109**, **dérivés de benzimidazoles**. JTK-003 est en essai de phase II. Il est probable que ces composés agissent de manière allostérique en bloquant l'activité d'élongation de la polymérase, en empêchant la formation d'un complexe polymérase correct (LaPlante *et al.*, 2004; Tomei *et al.*, 2003).

La détermination récente de la structure de la polymérase complexée (Di Marco *et al.*, 2005) montre que ces NNI se fixent sur la surface du domaine « pouce » dans une cavité normalement occupée par un des « doigts » de la polymérase (Figure 58 – NNI site A).

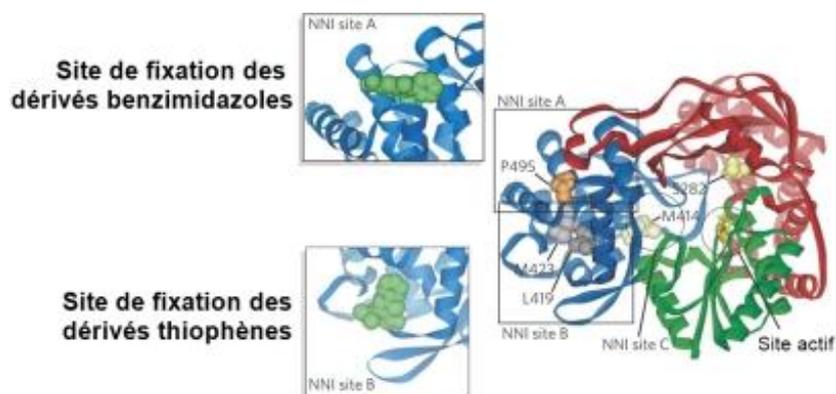


Figure 58 : Modélisation de NS5B avec les sites de fixation des inhibiteurs non nucléosidiques (NNI) les plus connus. (De Francesco et Migliaccio, 2005)

D'autres composés de ViroPharma/Wyeth (**HCV-796**) sont en cours d'essais cliniques après avoir été identifiés dans le système réplicon ; Rigel a également développé un composé, le **R803**. Son développement a été arrêté par manque d'efficacité du composé.

Beaucoup d'autres molécules de type NNI ont une action inhibitrice en culture cellulaires et vont entrer en essais cliniques prochainement (Beaulieu et Tsantrizos, 2004). Les **dérivés de thiophènes** ont bien été étudiés (Chan *et al.*, 2004) et se fixent sur un site différent du site de fixation des dérivés de benzimidazole (Figure 58 – NNI site B). La dernière classe d'inhibiteurs non nucléosidiques, les **dérivés de benzothiadiazines**, agissent d'une manière différente des deux autres classes (Tomei *et al.*, 2004) et sur des résidus non conservés entre les génotypes, ce qui pourrait avoir un impact sur leur développement clinique (Carroll et Olsen, 2004). Il faut cependant savoir que dans le cas du VIH, les NNI identifiés sont très actifs, très spécifiques mais provoquent trop rapidement l'émergence de mutants résistants (De Clercq *et al.*, 2005).

LES PYROPHOSPHATES MIMIQUES

Cette dernière classe d'inhibiteurs de la polymérase NS5B du VHC ne fonctionne pas par compétition avec la matrice ARN ou les nucléotides. La liaison d'acides di-céto se fait *via* les **cations bivalents** tels que le magnésium. Une hypothèse serait alors d'expliquer leur action *via* les ions métaux du site catalytique de l'enzyme comme montré avec des analogues de pyrophosphates tels que Foscarnet et l'acide phosphonoacétique (Sundquist et Oberg, 1979), ions bien visibles sur la Figure 59 représentant la polymérase NS5B.

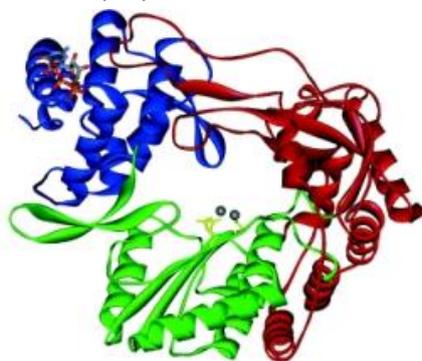


Figure 59 : La polymérase NS5B (De Francesco *et al.*, 2003).

Même si le potentiel thérapeutique de ces molécules reste à démontrer pour le VHC, des molécules similaires sont déjà bien connues (De Clercq, 2001a) et possèdent une action contre le VIH et le virus influenza en culture cellulaire et dans des modèles animaux (Hazuda *et al.*, 2000; Tomassini *et al.*, 1994).

LES ANALOGUES DE CYCLOSPORINE A : UN EFFET INDIRECT SUR NS5B

Des études récentes ont montré que la **cyclosporine A**, un immunomodulateur utilisé pour éviter les rejets de greffe, pouvait avoir une action contre le VHC. Elle interagit sur la cyclophiline B, une protéine cytoplasmique impliqué dans les voies d'activation et qui se fixe sur NS5B, augmentant alors la liaison à l'ARN et donc la traduction (Figure 60A). Si de la cyclosporine A est ajoutée, elle interagit avec la Cyclophiline B bloquant ainsi son interaction avec NS5B. La réplication est alors plus faible (Figure 60B).

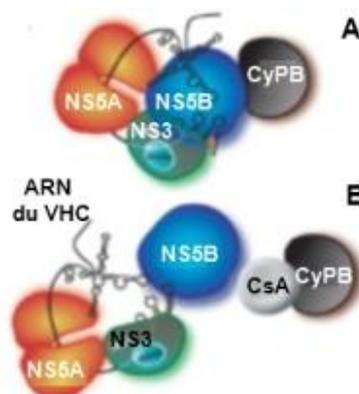


Figure 60 : La cyclophiline B, un régulateur fonctionnel de NS5B. (Rice et You, 2005)

Des dérivés de la cyclosporine A (Cys A) ont été créés et testés contre le VHC. Le composé **Debio-025** se lie 3,5 fois mieux à la cyclophiline que la Cys A et permet de prévenir *in vitro* le développement de résistances à un inhibiteur de protéase (Paeshuyse *et al.*, 2006).

2.5 - LE PROBLEME DE CES APPROCHES : L'APPARITION DE RESISTANCES.

Le problème majeur des approches basées sur des antiviraux ciblant les protéines virales est la **sélection de mutants résistants**. Cela a bien été décrit dans le cas des antiviraux ciblant le VIH-1 (Condra *et al.*, 2002) ou le virus de l'hépatite B (Brunelle *et al.*, 2005). Dans le cas du VHC, cela risque d'être un réel problème du fait de la variabilité naturelle très importante du virus (Smith *et al.*, 1995) et une approche par combinaison de molécules sera probablement obligatoire (Fried *et al.*, 2002). A ce jour plusieurs mutations spécifiques à un antiviral ont été identifiées. Les deux principaux inhibiteurs de protéase, VX-950 et BILN 2061, ont comme mutation principale *in vitro* respectivement Asp 158 et Ala 156 (Lin *et al.*, 2004a). Les études sur le SCH-503034 ont montré l'apparition d'une mutation A156T qui se traduit par une augmentation de la résistance supérieure à 100 fois. Les réplicons qui contiennent cette mutation ont cependant un niveau de réplication faible ce qui pourrait suggérer que le développement de haut niveaux de résistances en clinique soit lent (Tong *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2006).

Sans minimiser l'impact que vont avoir ces nouvelles molécules sur le traitement du VHC, comme cela a été le cas avec le VIH-1 et les trithérapies ou pour le VHB, il est important d'anticiper l'apparition de résistances. L'étude de nouvelles approches dont la **perspective vaccinale** accompagnée d'un **renforcement des réponses innées** et à long terme des **approches de type antisens** reste une priorité.

3 - APPROCHES IMMUNOLOGIQUES

3.1 - PERSPECTIVE VACCINALE

Il y a une décennie, la mise au point d'un vaccin contre le virus de l'hépatite C était considérée comme une possibilité éloignée. Trois principaux facteurs en étaient responsables : la forte propension du VHC à donner des **infections chroniques persistantes** (Alter et Seeff, 2000) ; plusieurs cas humains ou de chimpanzés convalescents et néanmoins réinfectés (Lai *et al.*, 1994) et la considérable hétérogénéité génétique du virus (Simmonds, 2004a).

Aujourd'hui la situation est plus positive pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il apparaît que plus de **50% des infections aiguës éliminent spontanément le virus** (Seeff, 2002) et que cette clairance virale est associée à une

réponse immune spécifique au virus. La reproduction de telles réponses par la vaccination serait donc une option réaliste. Il apparaît ensuite de plus en plus évident qu'**une immunité naturelle est en train d'émerger** à la fois chez les humains (Mehta *et al.*, 2002) et les chimpanzés (Bassett, 2001; Lanford *et al.*, 2004; Weiner, 2001). Cette protection préviendrait l'évolution vers la chronicité et l'installation d'une infection persistante suite à une réinfection. Enfin la mise au point très récente des **systèmes permettant de cultiver le VHC en cultures cellulaires** va permettre le développement de vaccins à base de virus inactivés. A ce jour en effet les différentes approches ont consisté à déclencher la production d'anticorps neutralisants les protéines d'enveloppe E1 et E2 à l'aide de polypeptides recombinants avec des adjuvants ou de déclencher une réponse T CD4+ ou CD8+, ce qui n'est pas aisé avec des polypeptides (Pearse et Drane, 2005; Polakos *et al.*, 2001).

Des **éléments de réponse** ont déjà été apportés avec le système des pseudo-particules (décrit page 57). Dans ce modèle, il a été montré que les patients ont non seulement des anticorps qui peuvent neutraliser les pseudo particules virales et que ces anticorps peuvent neutraliser de façon croisée des particules issues de différents génotypes du VHC (Bartosch *et al.*, 2003a; Logvinoff *et al.*, 2004; Meunier *et al.*, 2005). Il semblerait enfin que lorsque ces anticorps neutralisants sont présents, il y a une corrélation nette entre leur production et la clairance du VHC après une infection aiguë (Lavillette *et al.*, 2005) illustré par la Figure 61. Sur ce graphique, on voit nettement l'association entre la charge virale en ARN circulant (en bleu) et les anticorps qui neutralisent l'infectiosité des pseudo-particules (en violet ; expriment un pourcentage de neutralisation). Ces résultats ont été obtenus sur une cohorte de 17 patients suivis après une infection nosocomiale au VHC et encore non traités.

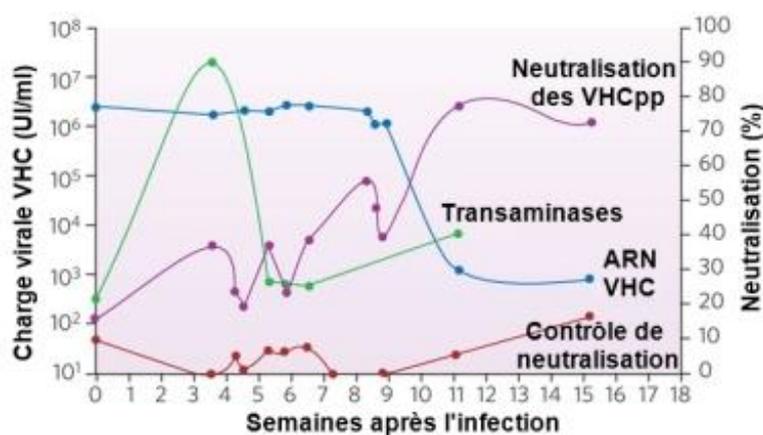


Figure 61 : Contrôle putatif de la virémie VHC aiguë par des anticorps neutralisants. (Houghton et Abrignani, 2005) adapté de (Lavillette *et al.*, 2005).

Une publication récente a permis de réaliser la **preuve de concept** d'une telle perspective (Folgori *et al.*, 2006). Pour la première fois il a été montré qu'un vaccin contre le VHC était capable d'induire une réponse T protégeant le chimpanzé d'une hépatite aiguë induite par un virus hétérologue. Dans cette étude, la suppression de la virémie aiguë chez des chimpanzés vaccinés est le résultat du développement massif de lymphocytes T CD8+ aux niveaux périphériques et intra-hépatiques qui réagissent de façon croisée avec le vaccin et les épitopes du virus (Figure 62). Un suivi de 18 mois a été réalisé chez des chimpanzés vaccinés ou contrôles ; un segment d'ADN codant les régions non-structurales (de NS3 à NS5B) d'un génotype 1b a été utilisé comme vaccin génétique en utilisant un vecteur adénoviral déficient pour la réplication. Les auteurs précisent que les régions ciblées sont conservées à 98% dans les génotypes 1 (80% des infections au niveau mondial) ce qui présage d'un potentiel important pour cette stratégie.

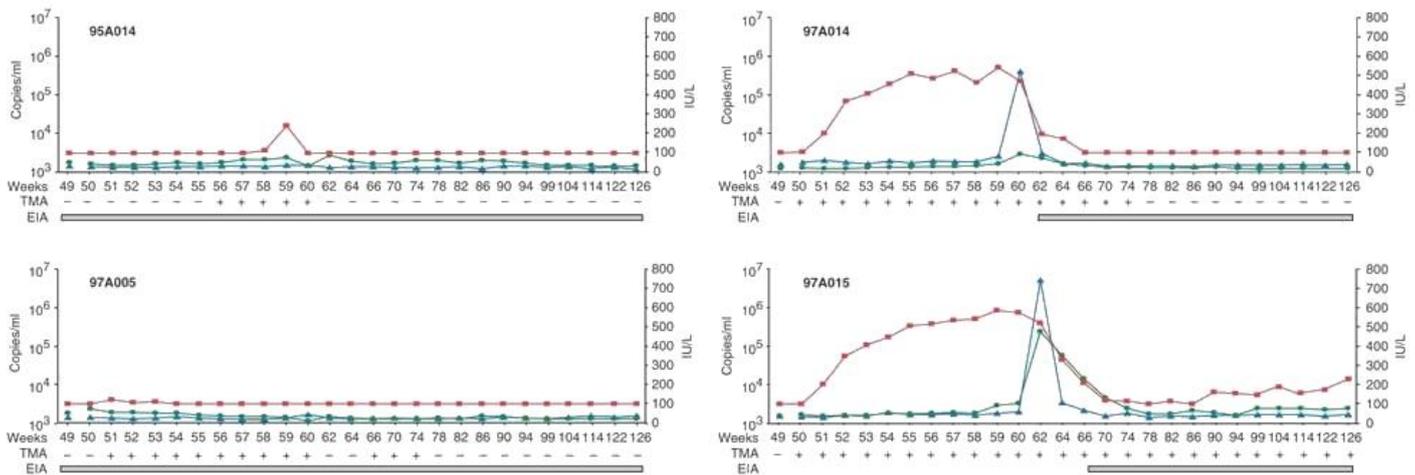


Figure 62 : Cinétiques d'ARN du VHC (rouge), des ALAT et GGT (en bleu et vert) et de la réponse anticorps VHC spécifique chez des chimpanzés vaccinés ou non. (Folgori *et al.*, 2006)

Deux perspectives de vaccins sont alors envisageables dans un délai raisonnable (<5 années):

- **un vaccin préventif** capable de maximiser les réponses cellulaires et humorales en cherchant une protection par des anticorps neutralisants cross réactifs par un cocktail d'immunogènes dérivés des différentes souches du VHC
- **un vaccin thérapeutique** qui permettrait de stimuler les réponses immunitaires des patients déjà infectés, s'ajoutant aux traitements actuels et futurs qui jamais ne seront pas optimaux du fait de l'émergence de mutants résistants.

Dans les deux cas, beaucoup d'essais sont en cours. Le problème aujourd'hui est en fait de trouver des populations à risque pour le VHC pour montrer l'efficacité de ces vaccins. Avec l'élimination probable des hépatites C post transfusionnelles, seuls subsistent des patients non compliants (utilisateurs de drogue i.v.) ou présentant une faible incidence d'infection (travailleurs dans la santé) ou encore tous les pays en voie de développement ou les infrastructures sont inexistantes (Houghton et Abrignani, 2005). Gageons quand même que vu l'importance de la mise au point d'un tel vaccin pour contrôler l'infection du VHC, ces obstacles ne seront pas insurmontables.

3.2 - RENFORCEMENT DES REPONSES INNEES

Dans l'optique de la mise au point d'un vaccin, les **agents stimulateurs de l'immunité** (adjuvants) sont des composants centraux en augmentant à la fois la magnitude et la durée de la réponse immunitaire. La nature des adjuvants peut déterminer un type particulier de réponse immunitaire (cytotoxique par les LT, anticorps, réponse *via* T helper). Le choix entre ces différentes réponses est important car selon les pathogènes, la protection requise est différente (Pulendran, 2004; Rappuoli, 2004). Les adjuvants les plus répandus, alum et à base d'huile - MF59 -, permettent d'augmenter les réponses de type anticorps mais n'ont pas d'effet sur les réponses immunes de type cellulaires. Les avancées récentes des recherches en immunologie commencent à mettre en évidence les mécanismes qui déclenchent l'immunité innée ou acquise, informations essentielles pour la mise au point de vaccins contre le VIH, le Dengue, la malaria ou le VHC qui posent problème depuis des années.

Un concept émergent dans l'immunité innée suggère que les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle critique comme senseur des pathogènes ou des vaccins, directement ou indirectement, et intègrent cette information pour réguler la quantité, la qualité et la longévité de la réponse immunitaire (Janeway Jr et Medzhitov, 2002). Des avancées significatives ont été réalisées dans les dernières années par la caractérisation des différents voies moléculaires associées aux récepteurs de reconnaissances des pathogènes (PAMP), notamment les TLR (Toll Like

Receptors) (Beutler, 2004; Germain, 2004; Janeway Jr et Medzhitov, 2002; Takeda *et al.*, 2003). Ces TLR, exprimés sur et dans les cellules du système immunitaire inné incluant les DC, les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les fibroblastes, sont exprimés par des sous-populations de DC et dans des compartiments cellulaires distincts. TLR9 est par exemple exprimé dans les endosomes des DC plasmacytoides et dans les LB (Figure 63) et joue un rôle dans la reconnaissance des virus (Akira *et al.*, 2006).

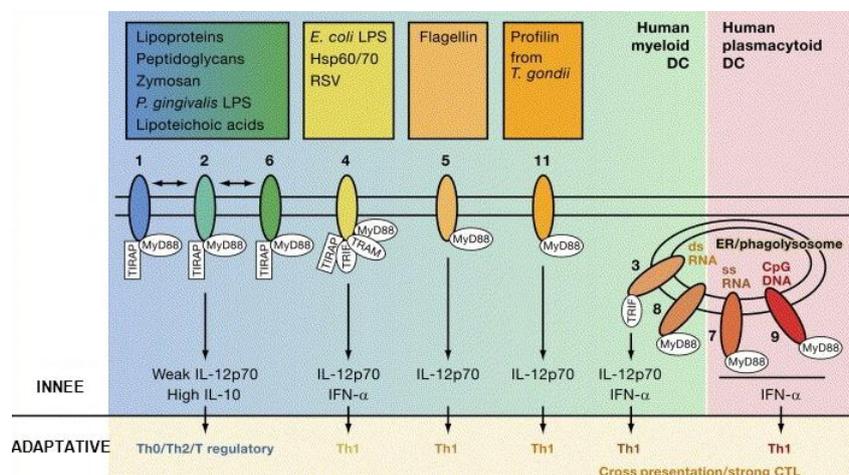


Figure 63 : La stimulation de TLR distincts sur des cellules dendritiques déclenche différents profils de cytokines et différentes réponses immunitaires. (Pulendran et Ahmed, 2006)

La mise au point d'un vaccin contre le VHC que nous avons décrit auparavant ne se fera pas de manière isolée de la recherche sur les TLR et de l'induction de la réponse innée. Des vaccins à ADN accompagné de **motifs CpG** (deoxycytosine- deoxyguanosine) ont été explorés et permettrait la stimulation des réponses innées et humorales spécifiques au VHC (Encke *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2004; Qiao, 2003).

IV - L'APPROCHE ANTISENS

A - GENERALITES

La stratégie antisens vise à moduler sélectivement l'expression des gènes, cellulaires ou viraux, par action directe sur les acides nucléiques. Elle repose sur l'utilisation de courts oligodésoxynucléotides synthétiques (ODN), capables de s'hybrider spécifiquement à une séquence nucléotidique. Entendu au sens large, elle englobe l'interférence ARN, les ribozymes et les aptamères, c'est-à-dire toutes les approches qui se basent sur la **reconnaissance d'une séquence nucléotidique pour fonder leur action**.

Les objectifs de cette dernière partie de rappels bibliographiques sont de **présenter les différentes approches** et leurs applications, mettre en évidence les **résultats obtenus contre le VHC** et de **développer un antisens particulier, le Peptide Nucleic Acid (PNA)** utilisé dans mon travail.

1 - PRINCIPE

Schématiquement, les ODN ont une action sur les ARNm, par fixation d'une séquence antisens, comme illustré par la Figure 64.

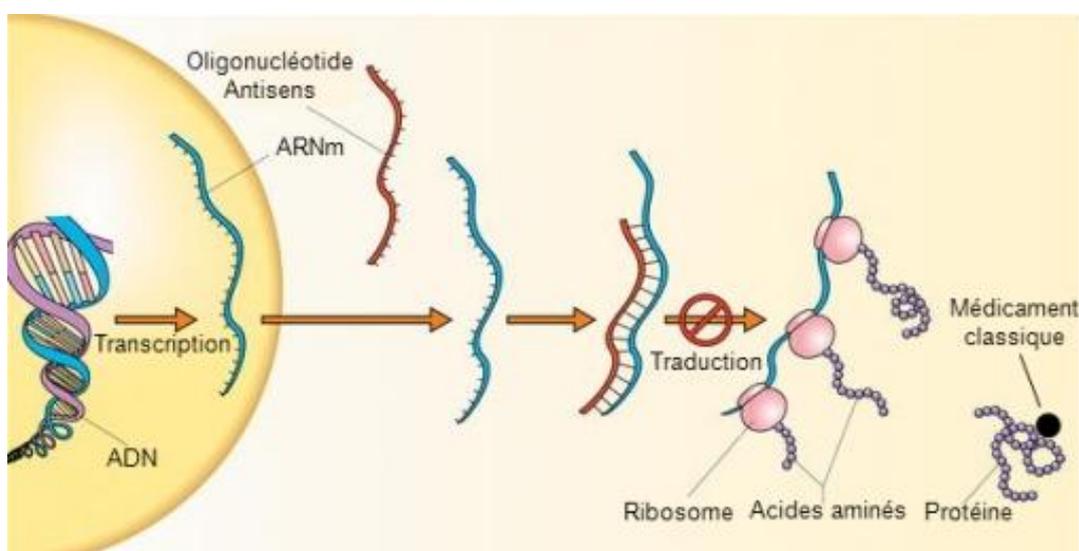


Figure 64 : Schéma de l'action d'un antisens

L'objectif est donc d'empêcher qu'un ARN, viral ou cellulaire, soit traduit en protéines responsables de la maladie. A la différence d'un « médicament classique » qui essaye de corriger une protéine défectueuse ou indésirable, l'idée fondatrice d'une stratégie antisens est de faire en sorte que cette protéine n'existe plus.

2 - MECANISMES D'ACTION

La figure précédente est en faite très schématique. Dans la réalité, les ODN agissent à plusieurs niveaux *via* plusieurs mécanismes. Potentiellement, ces molécules peuvent moduler le transfert d'information du gène à la protéine à toutes les étapes, comme illustré par la Figure 65 ci-après.

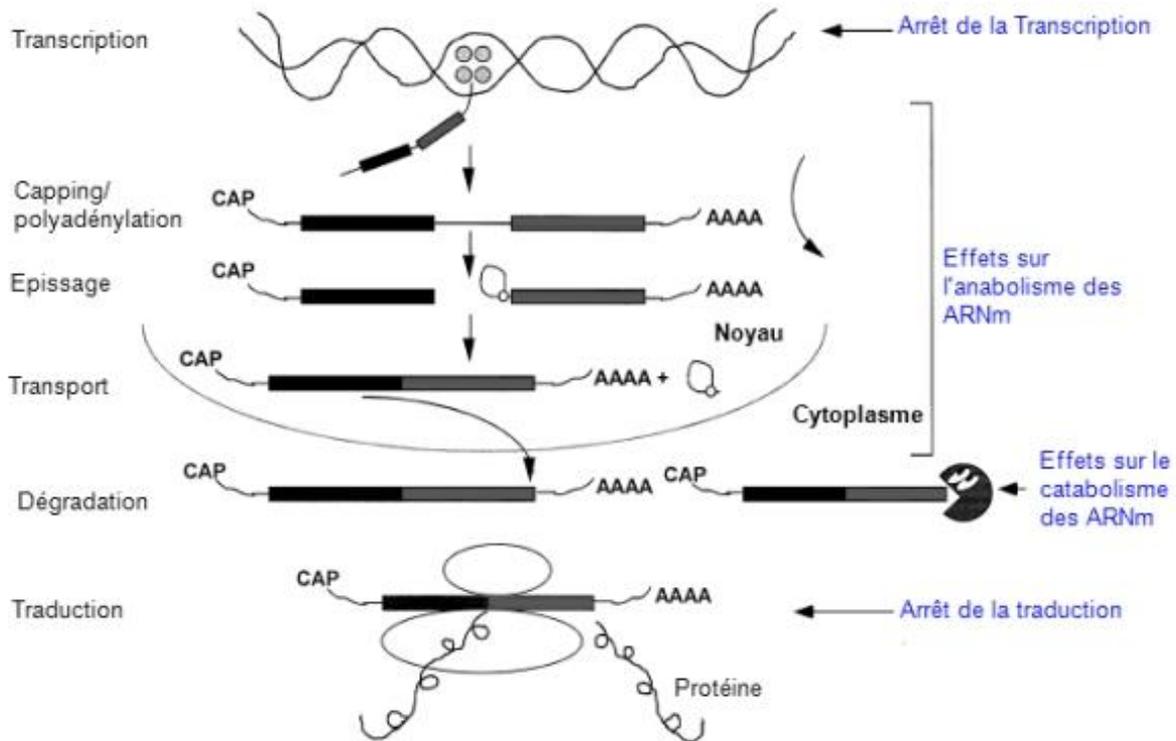


Figure 65 : Du gène à la protéine, cibles des ODN. (Crooke, 1999)

En pratique, l'action des ODN va se faire par **coupure de l'ARN par la RNase-H** dans la plupart des cas. De nombreux autres mécanismes de blocage ont été décrits et peuvent être regroupés en deux catégories : **action des ODN seulement par occupation du transcrit** et **action par occupation entraînant la déstabilisation du transcrit** (Crooke, 1999).

2.1 - ACTIVATION DE LA RNASE-H

La ribonucléase H (RNase-H) est présente dans toutes les cellules de mammifères. Elle régule naturellement les niveaux de 85 à 95 % des ARN dans les cellules. Elle reconnaît également les hybrides ADN/ARN et hydrolyse spécifiquement les liaisons phosphodiesteres de la partie ARN (Figure 66). Cette activité enzymatique est présente principalement dans le noyau puisqu'elle est nécessaire à l'élimination des amorces ARN utilisées lors de la réplication de l'ADN.

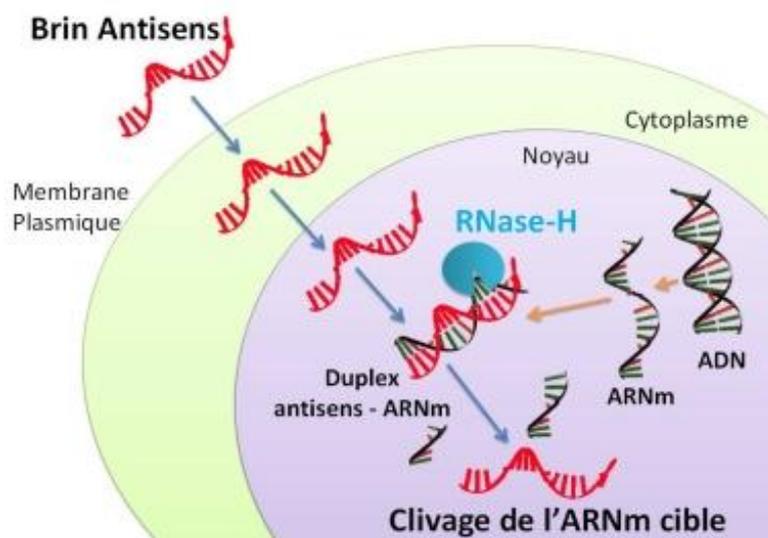


Figure 66 : Schéma de fonctionnement de la RNase H. (Crooke, 2004)

Son activité est très sensible à la nature chimique des modifications que comportent les ODN. Seuls les désoxyribonucléotides naturels et leurs analogues comportant des phosphorothioates (voir page 91) sont capables d'induire une coupure de l'ARN cible. Les ODN de première génération sont donc basés sur cette propriété de la RNase-H.

Malgré les avantages de cette enzyme, il existe de nombreuses autres possibilités d'actions antisens indépendante de la RNase-H.

2.2 - ACTION PAR OCCUPATION DU TRANSCRIT

Les compétiteurs antagonistes classiques altèrent les activités biologiques en se liant aux récepteurs, empêchant alors la liaison des agonistes naturels et l'induction des processus biologiques. Les ODN peuvent fonctionner de la sorte et se lient à des séquences spécifiques. Ils inhibent alors l'interaction de l'ARN ou de l'ADN avec les protéines, d'autres acides nucléiques ou des facteurs nécessaires aux étapes essentielles du métabolisme intermédiaire des ARN (Figure 65) ou leur utilisation par la cellule.

Certains ODN peuvent ainsi **empêcher l'épissage, modifier la structure de l'ARN** en se fixant dans des régions structurées ou **bloquer physiquement la traduction**.

BLOPAGE DE LA TRADUCTION

La fixation d'un ODN entre la coiffe (Cap) en 5' et le codon d'initiation AUG ou dans la région à proximité du codon d'initiation empêche l'assemblage correct de la machinerie de traduction. C'est sur cette approche que sont basées nos études 2 & 3. Notons que la fixation d'un ODN dans la région codante de l'ARN messager n'a aucun effet, probablement en raison de son déplacement par la machinerie de traduction. Le ribosome a en effet la capacité de dérouler les structures secondaires complexes d'ARN (Shakin et Liebhaber, 1986). Seuls les ODN de type PNA sont capables de bloquer la machinerie de traduction dans sa progression.

2.3 - ACTION PAR DESTABILISATION DU TRANSCRIT

Une dernière possibilité d'action des ODN peut être de cibler les deux étapes clefs pour la stabilité d'un transcrit ARN eucaryote : sa **polyadénylation en 3'** et **l'adjonction de la coiffe en 5'**.

Dans les deux cas, plusieurs études ont montré des résultats intéressants (Baker et Monia, 1999). Cela n'est toutefois pas envisageable dans le cas des ARN du VHC qui ne sont ni coiffés, ni polyadénylés.

3 - PARAMETRES CONTROLANT L'EFFICACITE DES ANTISENS

De nombreux paramètres ont une influence sur l'activité antisens des ODN. Les principaux sont présentés ci-dessous.

3.1 - STABILITE VIS-A-VIS DES NUCLEASES

Le temps de demi-vie ($T_{1/2}$) des ODN représente un paramètre très important qui décrit le temps de résistance à la dégradation par les nucléases cellulaires. Les ODN naturels sont rapidement dégradés ($T_{1/2} = 15-60$ min) dans les milieux de culture cellulaire, le plasma et les cellules par les endo et exo-nucléases, notamment les 3'-exonucléases qui sont les plus actives (Agrawal *et al.*, 1995; Agrawal et Zhang, 1997). Des modifications de l'extrémité 3' des ODN sont suffisantes pour allonger leur temps de vie. Nous détaillerons différentes approches portant sur des modifications des liaisons phosphodiester page 91.

3.2 - STABILITE DE L'HYBRIDE FORME AVEC L'ARN

L'hybride formé entre l'ODN et l'ARN doit être suffisamment stable pour inhiber la traduction, même lorsque la RNase H intervient. La formation de cet hybride dépend de la température et de la concentration en sels. Si la température de fusion (T_m) de l'hybride est supérieure à 37°C, il sera stable à 37°C. La stabilité augmente avec le nombre de paires G-C et la longueur de l'ODN. En général, des ODN de 15-20 mers sont utilisés dans la stratégie

antisens. Le problème avec des ODN plus courts est qu'ils peuvent avoir un T_m proche de la température physiologique et que le taux de formation des hétéro-duplex va être faible. Notons que cette valeur de T_m n'est pas prédictive de l'efficacité du composé et qu'elle varie selon le type d'ODN utilisés. D'autres facteurs comme la localisation ou l'accessibilité de la cible vont avoir un rôle déterminant.

3.3 - SPECIFICITE DE L'ANTISENS POUR SA CIBLE

En principe, les ODN sont conçus pour être hautement spécifiques de la séquence d'ARN choisie. Dans l'optique du blocage des gènes cellulaires, un ODN de **17 nucléotides** ne devrait trouver statistiquement qu'une cible dans le génome humain tout en discriminant des cibles avec un ou plusieurs nucléotides (Branch, 1998). Les ODN de même taille sont aussi utilisés pour bloquer les gènes viraux.

L'utilisation d'ODN plus longs augmente le risque d'effets non-spécifiques liés aux mésappariements : un hybride de seulement 7 à 10 pb suffit pour être reconnu et clivé par la RNase-H (Wagner *et al.*, 1996).

3.4 - ACCESSIBILITE DE LA CIBLE

Les **structures secondaires** formées par l'ARN ainsi que la **présence de protéines associées** limitent le nombre de régions accessibles aux ODN (Wagner *et al.*, 1996). Plusieurs études ont montré par exemple que la région située au voisinage du codon d'initiation AUG était accessible à des ODN. Mais cette observation n'est pas une règle et il est très difficile de prédire l'accessibilité de fragments d'ARN aux ODN *in vivo*. Généralement c'est en testant de nombreuses possibilités que l'on trouve un composé actif.

3.5 - PENETRATION DES ANTISENS ET DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE

Il s'agit d'un **paramètre critique** dans l'efficacité des ODN *in vitro* et *in vivo* car une concentration intracellulaire élevée est nécessaire pour inhiber la traduction. La pénétration dans la cellule dépend d'une part de la longueur, de la séquence et de la nature chimique de l'ODN et d'autre part du type cellulaire et des conditions d'administration.

Il semble que les ODN soient internalisés naturellement par des mécanismes actifs (Loke *et al.*, 1989). Une endocytose *via* un récepteur et/ou la pinocytose sont probablement impliqués dans l'internalisation. Plusieurs hypothèses ont été émises et plusieurs candidats récepteurs identifiés. Il est certain que les cellules capables de phagocytose (macrophages, cellules de Kupffer, cellules tubulaires proximales) concentrent naturellement les ODN. Elles ne sont cependant pas les seules et les hépatocytes, les cellules endothéliales vasculaires, etc... peuvent internaliser des ODN naturellement.

In vitro, les stratégies pour augmenter la pénétration cellulaire consistent à transfecter les ODN non modifiés à l'aide de liposomes riches en lipides cationiques ou en modifiant les ODN en les couplant à des peptides.

Si *in vitro* toutes les stratégies sont possibles, il n'en va pas de même *in vivo* où il faut trouver un équilibre entre les bénéfices du traitement et ses effets secondaires. **Les problèmes liés à la pénétration *in vivo* de molécules à visée médicale (antisens et autres) restent les plus difficiles à surmonter.** Le sujet sera approfondi dans le cas des PNA à partir de la page 106.

3.6 - TOXICITE

En dépit de la simplicité apparente de l'approche antisens, il a été montré que les ODN peuvent induire des effets indésirables par leur interaction avec d'autres molécules. La majorité de ces effets a été décrit pour les ODN de type phosphorothioates par interaction avec des protéines pouvant induire une toxicité du composé.

Ici encore, la toxicité dépend du type de molécules utilisées dans la stratégie que nous allons décrire maintenant.

4 - OLIGONUCLEOTIDES UTILISES DANS LA STRATEGIE ANTISENS

Avec le développement du séquençage et de l'identification de gènes responsables de maladies, de grands espoirs ont été fondés sur cette approche d'intervention directe sur la production de la protéine, dans le cas par exemple de maladies génétiques aboutissant à une augmentation de protéines ou de cancers. Aujourd'hui, il faut admettre que ces espoirs ont été largement déçus même si l'ARN interférence représente un nouveau souffle.

Dès les premiers essais, la **stabilité des ODN** a représenté un obstacle important dans le développement de ces composés. Depuis, pratiquement toutes les composantes du nucléotide ont été modifiées. A condition que ces modifications n'altèrent pas la capacité du composé à s'hybrider de manière spécifique à sa cible, ces modifications ne posent pas de problème.

Voyons alors **les deux générations d'antisens** et les **possibilités de développements futurs**.

4.1 - PREMIERES GENERATIONS D'ANTISENS

De la première génération d'oligonucléotides analogues, la classe qui a obtenu les activités les plus larges et la mieux caractérisée est celle des **phosphorothioates (PS-ODN)**. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1969 (De Clercq *et al.*, 1969). En comparaison avec les désoxyribonucléotides composants l'ADN, un des atomes d'oxygène non liant du groupement phosphate a été remplacé par un groupement sulfure (Figure 67). Le composé reste chargé négativement mais présente une résistance accrue aux nucléases (Akhtar *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1990; Shaw *et al.*, 1991)

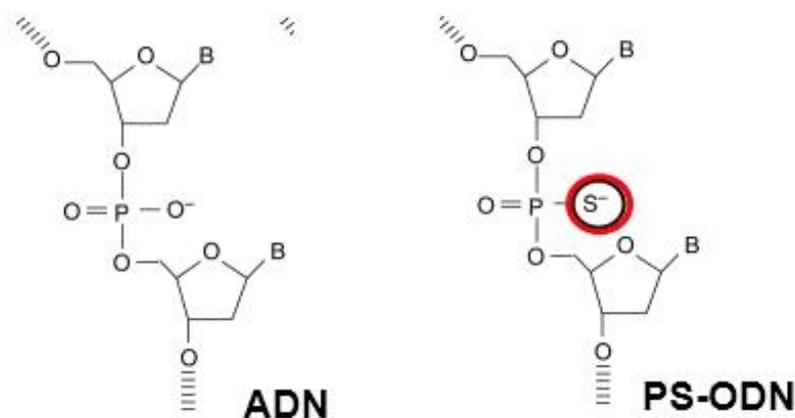


Figure 67 : ADN vs Phosphorothioates (PS-ODN).

Au niveau de **l'hybridation à l'ARN**, les PS-ODN ont un Tm d'environ -0,2°C par unité comparé à des duplex d'ARN (Freier, 1993). Cela signifie que *in vitro* une taille de 17 à 20 mer est requise (Crooke, 1993; Monia *et al.*, 1992).

La **stabilité aux nucléases** est bonne mais pas autant que les premières données l'auraient laissé supposer. En effet, les PS-ODN ne sont pas dégradés par la majorité des nucléases (Campbell *et al.*, 1990; Hoke *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1991; Wickstrom, 1986) mais sont des inhibiteurs compétitifs de ces nucléases utilisées à des hautes concentrations (Gao *et al.*, 1992), ce qui a conduit à ces surestimations. Dans les tissus, la demi-vie est de 12-24h (Crooke *et al.*, 1995) et les PS-ODN sont métabolisés lentement chez les animaux, probablement par des exonucléases (Sands *et al.*, 1994).

Concernant la **pénétration cellulaire**, les PS-ODN entrent dans une large gamme de cellules *in vitro* par un mécanisme mal compris mais qui permet une large distribution dans les cellules, avec des variations selon les lignées (Loke *et al.*, 1989). Des lipides cationiques permettent d'augmenter cette entrée (Bennett *et al.*, 1992).

Des études de **pharmacocinétiques** ont montré que les PS-ODN sont bien absorbés, distribués largement dans tous les tissus périphériques, ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, et sont éliminés lentement par le métabolisme (Crooke, 1996). *In vivo*, les résultats sont très contrastés et varient en fonction du PS-ODN lui-même et

des modes d'administration. Une administration par voie orale n'est pas envisageable, une administration systémique permet une distribution efficace au foie, à la rate, au rein et aux cellules graisseuses. Une administration par aérosol ou locale permet d'atteindre des organes plus spécifiques. Globalement, c'est une limitation réelle à l'usage clinique des premières générations d'antisens (Crooke, 2004).

Les **effets non-antisens** des PS-ODN ont été évalués. Ils sont nombreux par fixation sur des protéines, ce qui peut souvent porter à confusion avec l'activité antisens. Les polymérases sont particulièrement inhibées. Cela a conduit à de nombreuses erreurs dans l'interprétation des mécanismes d'action de cette classe d'oligonucléotides (Stein et Krieg, 1994). De plus, beaucoup de PS-ODN se sont révélés actifs par similarité aux CpG (des séquences d'ADN pro inflammatoires activant les TLR comme nous l'avons vu page 83) entraînant *in vivo* à des doses supérieures à 10mg/kg/jour une toxicité par inflammation importante (Henry *et al.*, 1997). L'interaction avec des protéines n'est cependant pas forcément néfaste. Les PS-ODN interagissent par exemple avec l'albumine sérique. L'affinité d'une telle interaction est faible, $\approx 200\mu\text{M}$ soit du même niveau que l'interaction de l'albumine à l'aspirine ou à la pénicilline (Crooke *et al.*, 1996; Joos et Hall, 1969). Cela permet d'éviter une élimination rapide des molécules par filtration glomérulaire, autorisant une distribution dans les tissus périphériques.

BILAN

En tenant compte des dégradations par les nucléases des PS-ODN, de leur affinité moyenne pour l'ARN, des profils de distribution et de leurs effets non-antisens, cette première génération a soulevé plus d'espoir que de résultats. Depuis la première démonstration que des molécules agissant en antisens pouvaient inhiber l'expression de gènes dans le *Sarcome de Rous* (Zamecnik et Stephenson, 1978), un seul médicament à base de PS-ODN a fait son apparition dans la pharmacopée (Crooke, 2004). Commercialisé sous le nom de Vitravene® par la société Novartis Optalmics / Isis Pharma, ce médicament est destiné à lutter contre une infection opportuniste fréquente chez les patients infectés par le VIH, une rétinite causée par le CytomégaloVirus (CMV). Il tire profit de sa cible, l'œil, qui est facilement accessible par administration directe. Peut être pouvons nous faire le rapprochement avec l'acyclovir, premier antiviral à être autorisé et qui était également appliqué localement... Pour ce qui est des autres PS-ODN en développement clinique, les échecs de Affinitak (agent anti cancéreux contre la protéine C- α développé par Lilly / Isis Pharma) et de Genasense (un anticancéreux contre BCL-2 développé par Genta / Aventis) en phase III, et interdits de mise sur le marché par manque d'efficacité, forcent au pessimisme quant à l'avenir de cette génération d'antisens (Winkler, 2004).

Aujourd'hui la recherche se concentre donc sur des nouvelles modifications des composés, visant à corriger les défauts de « jeunesse » de la technologie. Depuis la fin des années 1990 – début des années 2000, on parle de **deuxième génération d'antisens** (Agrawal et Kandimalla, 2000).

4.2 - DEUXIEMES GENERATIONS D'ANTISENS

Comme nous venons de le montrer, les avancées ont été nombreuses mais souvent accompagnées par des déceptions au final. Ces obstacles ont toutefois permis des **avancées considérables dans la compréhension des mécanismes d'action** et surtout ont permis **d'identifier les éléments responsables des effets indésirables** observés avec les PS-ODN.

En résumé, les études ont montré 4 limitations aux PS-ODN, illustrées dans la Figure 68

- Une **activité** trop faible
- Des **effets polyanioniques**
- Des effets **immunostimulateurs**
- Des effets « **leurre** »

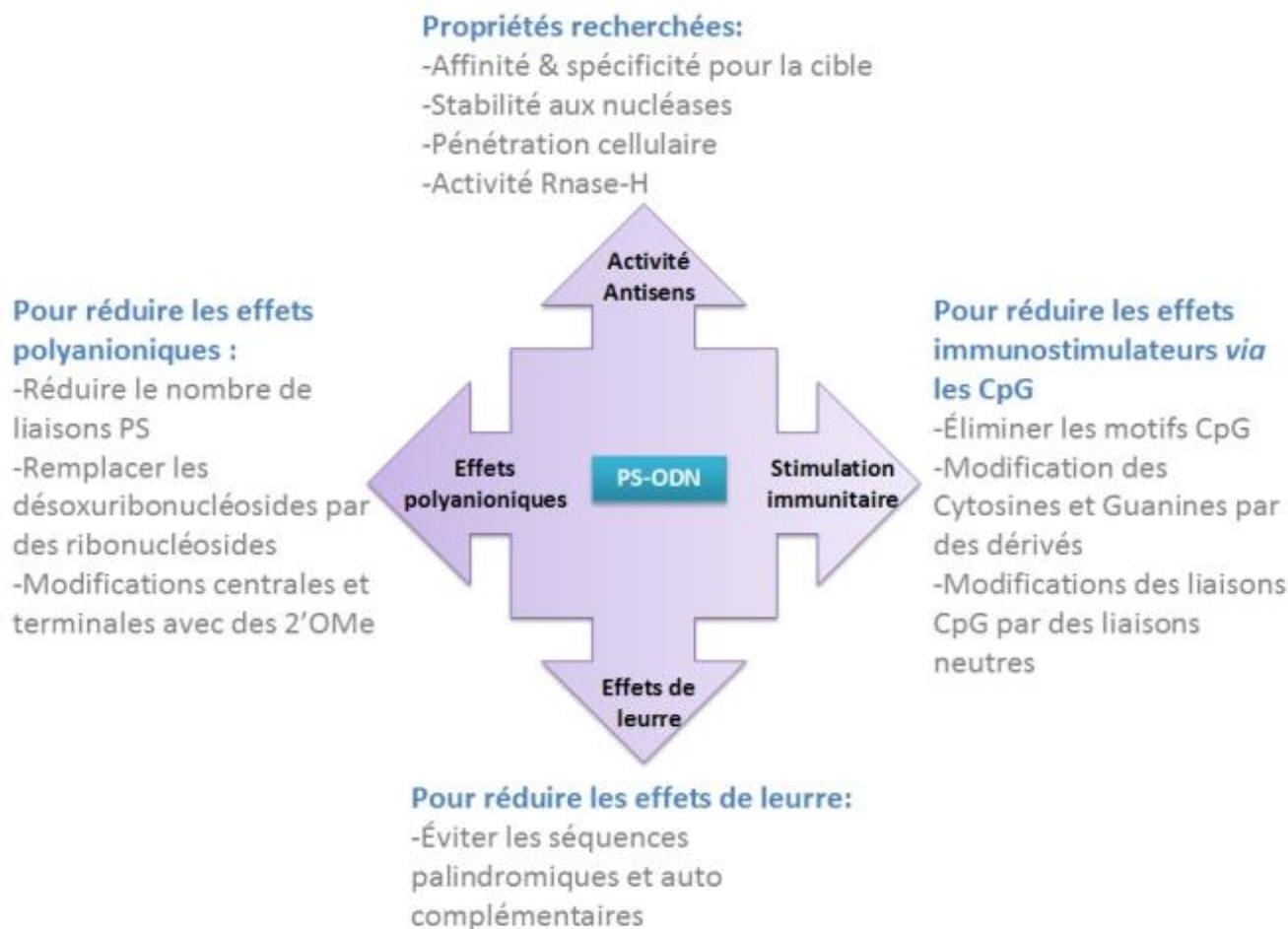


Figure 68 : Facteurs affectant la spécificité des antisens et les stratégies employées pour y remédier. (Agrawal et Kandimalla, 2000)

Les effets **immunomodulateurs** observés ont été reliés aux motifs CpG contenus dans les PS-ODN (Branda *et al.*, 1993; Kuramoto *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1996) et se traduisent par une induction des cytokines : IL-12, IL-6, IFN- γ , TNF- α (Klinman *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1997). Cela dépend de la séquence, de la composition en bases et de la position des motifs CpG dans la séquence. Les PS-ODN avec des motifs CpG sont désormais étudiés pour ces propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires comme détaillé page 83. Un certain nombre de stratégies ont été déployées pour limiter ces effets, la plus importante consistant à éliminer ces séquences et lorsque cela est impossible à modifier les riboses sur le résidu 2' en ajoutant un groupement méthyl (2' O Me) ou à modifier les liaisons entre les sucres par des méthyl phosphonates (Agrawal et Zhao, 1998).

Il a également été remarqué que la **présence de structures secondaires** dans les oligonucléotides pouvait conduire à des interférences avec des protéines de types facteurs d'initiation, interférant alors avec la transcription. Cet effet qualifié de « leurre » est bien compris (Park *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 1996) et est également devenu un nouvel espace de recherches avec les aptamères que nous détaillerons page 97. Il est également probable que certains ODN fonctionnaient comme des shRNA (voir p. 98) mais n'avaient pas été identifiés comme tels.

Enfin, la **charge globale négative des PS-ODN** s'est révélé être un problème. Elle active en effet le complément et prolonge le temps d'activation de la thromboplastine partielle (aPTT), une mesure de la coagulation sanguine (Kandimalla *et al.*, 1998). Des dérivés non chargés ont donc été mis au point comme les 2' O Me, des méthylphosphonates et toute une gamme de liaisons atypiques représentés par les morpholino, les PNA, etc... qui ont des effets négligeables. Le problème est alors que ces dérivés n'activent plus la RNase-H, base de l'action des antisens. Il a donc été tenté de réaliser des antisens au squelette « mélangé » (MBO pour *Mixed Backbone*

Oligodeoxynucleotides), pour trouver le bon équilibre entre effets désirables et indésirables (Agrawal *et al.*, 1997). Au final on a plusieurs familles d'**antisens de deuxième génération**, illustrées dans la Figure 69.

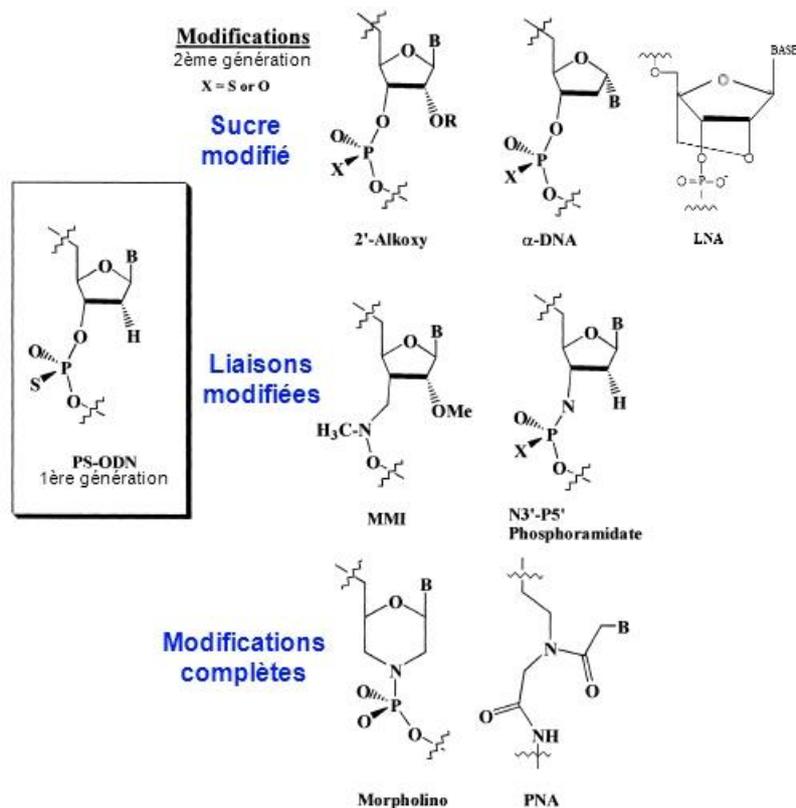


Figure 69 : Structures des principaux oligonucléotides antisens de deuxième génération. (Baker et Monia, 1999)

On peut alors avoir des modifications du sucre seul (LNA et 2' O Me en particulier), des liaisons phosphodiesteres (NP et les méthyphosphonates) ou complètes du sucre et des liaisons (Morpholinos et PNA). S'ajoutent à ces modifications une utilisation dorénavant classique de mélanges entre ces différentes solutions pour arriver au bon équilibre charge/activité (MBO)

On le voit donc, il n'y a plus aujourd'hui une approche antisens mais des **combinaisons d'approche**. En résumé, deux grandes dynamiques s'imposent: une application de ces ODN de 2^{ème} génération de type 2'O Me avec un squelette mélangé (MBO) et 3 dérivés majeurs : les PNA, LNA et Morpholinos.

2' O M E – M B O

La plupart de ces dérivés sont développés par la firme ISIS Pharmaceutical et sont des composés à la biochimie complexe. Ils ne présentent pas de toxicité particulière et les premières données de phase I ou II semblent très encourageantes (Figure 70). Il apparaît clairement que la compréhension du mécanisme de fonctionnement, les améliorations des composés et des modes d'administration n'ont pas été vaines. Une dizaine de 2'O Me – MBO sont actuellement en phase II et dirigés contre des protéines impliquées dans le cancer ou des infections virales (Winkler, 2004).

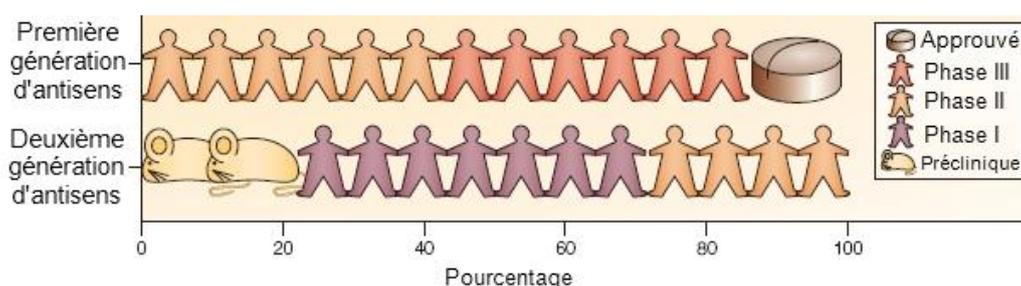


Figure 70 : Proportion d'agents ciblant l'ARNm dans chaque phase de développement clinique. (Winkler, 2004)

LNA, PNA ET MORPHOLINOS

Ces trois dérivés présentent des caractéristiques très intéressantes et semblent émerger à la fois comme **approches thérapeutiques** mais également comme **outils de biologie moléculaire** (Karkare et Bhatnagar, 2006).

- Les **LNA** (Singh *et al.*, 1998) ont la capacité, comme les PNA et les morpholinos, de réaliser des duplex et des triplex avec leur cible et présentent une bio-stabilité améliorée. Ils reconnaissent avec une très haute affinité l'ADNsb et l'ARNsb. Ils sont utilisés pour réaliser des oligos pour des hybridations ou servent de sondes en PCR temps-réel. Des applications thérapeutiques et diagnostiques ont également été décrites.
- Les **PNA**, dont les caractéristiques principales se rapprochent des LNA, seront détaillés dans la partie suivante à partir de la page 103.
- Les **Morpholinos** (Summerton, 1989) ont été conçus pour contourner le coût liés aux analogues d'ADN. Ils sont devenus un outil majeur d'extinction classique (i.e. sans interférence ARN, voir p. 98) de gènes en biologie du développement du fait des possibilités de distribution cytosolique des composés par micro-injections (Ekker et Larson, 2001).

On voit donc que les développements de la stratégie antisens vont beaucoup plus loin que sa seule application clinique. Qu'en est-il des futurs développements ?

4.3 - GENERATIONS FUTURES ?

Aujourd'hui, on ne distingue plus **une** nouvelle génération d'antisens même si dans l'esprit de tous, la technologie ARNi (voir p. 98) semble être le futur des technologies basées sur la reconnaissance d'une cible ARN. C'est en fait un nouvel espace de recherches qui a été ouvert depuis presque 30 ans. Dorénavant l'ARN n'est plus considéré comme le seul support de l'information génétique mais comme un « récepteur » dans un contexte d'interactions drogue – récepteur. A ce titre, l'hybridation de type « Watson & Crick » à la base de cette interaction, jouit d'un intérêt renouvelé puisqu'à portée pharmacologique (Breaker, 2004; Crooke, 2004).

C'est avec cette vision « renouvelée » qu'il faut donc considérer les développements futurs. J'ai choisi de développer plus particulièrement trois technologies en pleine expansion qui pourraient être les héritiers des antisens : les **ribozymes**, les **aptamères** et bien sûr les **ARNi**.

4.3.1 - RIBOZYMES

Les ribozymes sont l'exemple parfait que les acides nucléiques peuvent avoir des fonctions autres que de s'associer en double brins. Leurs capacités à catalyser la coupure d'un brin d'ARN avec seulement un enchaînement de 30 nt (Uhlenbeck *et al.*, 1989) ou encore à catalyser la formation d'une liaison peptidique dans les ribosomes (Nissen *et al.*, 2000; Steitz et Moore, 2003) permet d'envisager leur utilisation comme agents thérapeutiques.

Ce sont des molécules d'ARN qui peuvent se lier à l'ADN de manière antisens spécifiquement à une séquence et qui possèdent des propriétés catalytiques permettant le clivage d'ARN. Identifiés au départ avec la RNase P et les introns de type I, ce sont des ARN qui portent une information et ont une activité propre (Cech *et al.*, 1981). On connaît aujourd'hui une dizaine de ribozymes chez plusieurs virus, dans des eucaryotes inférieurs, dans des bactéries et dans des champignons (Phylactou, 2000).

Bien que le rôle de ces molécules dans l'évolution soit peu documenté, ces molécules font l'objet de nombreuses recherches sur leurs structures et sur leurs fonctions dans l'objectif de les utiliser comme **outils dans la manipulation des ARN**.

On distingue deux types de ribozymes : les « **hammerhead** » (à tête de marteau) et les **introns de groupe I**.

Ces ribozymes pouvant être utilisés pour **réparer des messagers défectifs**, les recherches se sont concentrées sur les virus dans l'espoir de modifier les génomes et sur les cancers dans lesquels il y a une mutation (par exemple sur un gène suppresseur de tumeur). Des travaux sur un type d'anémie génétique (Kaplan, 1998) ou sur des dystrophies myotoniques (Phylactou, 2000) semblent valider le modèle.

Il convient cependant de modérer ces résultats. De nombreux problèmes, essentiellement liés à la pénétration des ribozymes dans les cellules, freinent les essais cliniques de ces molécules qui restent malgré tout porteuses d'un grand espoir.

4.3.2 - APTAMERES

Les aptamères utilisent la capacité des ODN antisens à se lier à des protéines et sont basés sur les ribozymes (Figure 73). Ce sont des molécules d'ARN ou d'ADN structurées et qui forment des « poches » dans lesquelles se fixent des ligands spécifiques (Gold *et al.*, 1995; Osborne et Ellington, 1997). Par évolution dirigée, à partir de millions de séquences d'ARN ou d'ADN, on sélectionne et amplifie une population capable de se fixer à une protéine en particulier. Dans ce cas, un pool aléatoire de séquences est mis sur une colonne où est immobilisée une cible. Par des cycles d'élution - sélection, on identifie des **aptamères nucléiques** capables d'interagir spécifiquement avec la protéine cible.

De la même façon, on peut utiliser des ribozymes générés avec des séquences aléatoires (i.e : des **ribozymes allostériques**). En présence d'une protéine qui se lie au ribozyme, celui-ci va alors se cliver. Par analyse des populations on identifie alors les ribozymes allostériques qui reconnaissent une protéine donnée.

Au final, on identifie des **séquences nucléiques** capables de bloquer des protéines, agissant alors comme des agents thérapeutiques (Peracchi, 2004) ou comme interrupteurs moléculaires. On identifie également des **ribozymes allostériques** utiles par exemple dans des systèmes de détection comme la chromatographie (Deng *et al.*, 2001; Romig *et al.*, 1999) ou des bio-senseurs (Hamaguchi *et al.*, 2001; Hermann et Patel, 2000; Jhaveri *et al.*, 2000; McCauley *et al.*, 2003), dans des applications où classiquement des anticorps sont utilisés (Jayasena, 1999).

Les applications peuvent alors être très variées mais se pose, comme pour les ODN antisens, le problème de la pénétration dans les cellules et de la stabilité aux nucléases. Des modifications ont été suggérées au niveau des liaisons ou des riboses en 2' (Beaudry *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1994). Il est également possible de faire s'exprimer directement dans la cellule ces aptamères en les intégrant dans des constructions intégrées (Famulok et Verma, 2002; Homann et Goringe, 2001; Toulme *et al.*, 2004).

La limitation actuelle est au niveau du nombre d'interventions manuelles nécessaires à la génération des aptamères. Des méthodes d'automatisation commencent cependant à apparaître et devraient rendre exponentiel le nombre d'études (Cox, 2002a; Cox, 2002b; Cox et Ellington, 2001; Sooter, 2001).

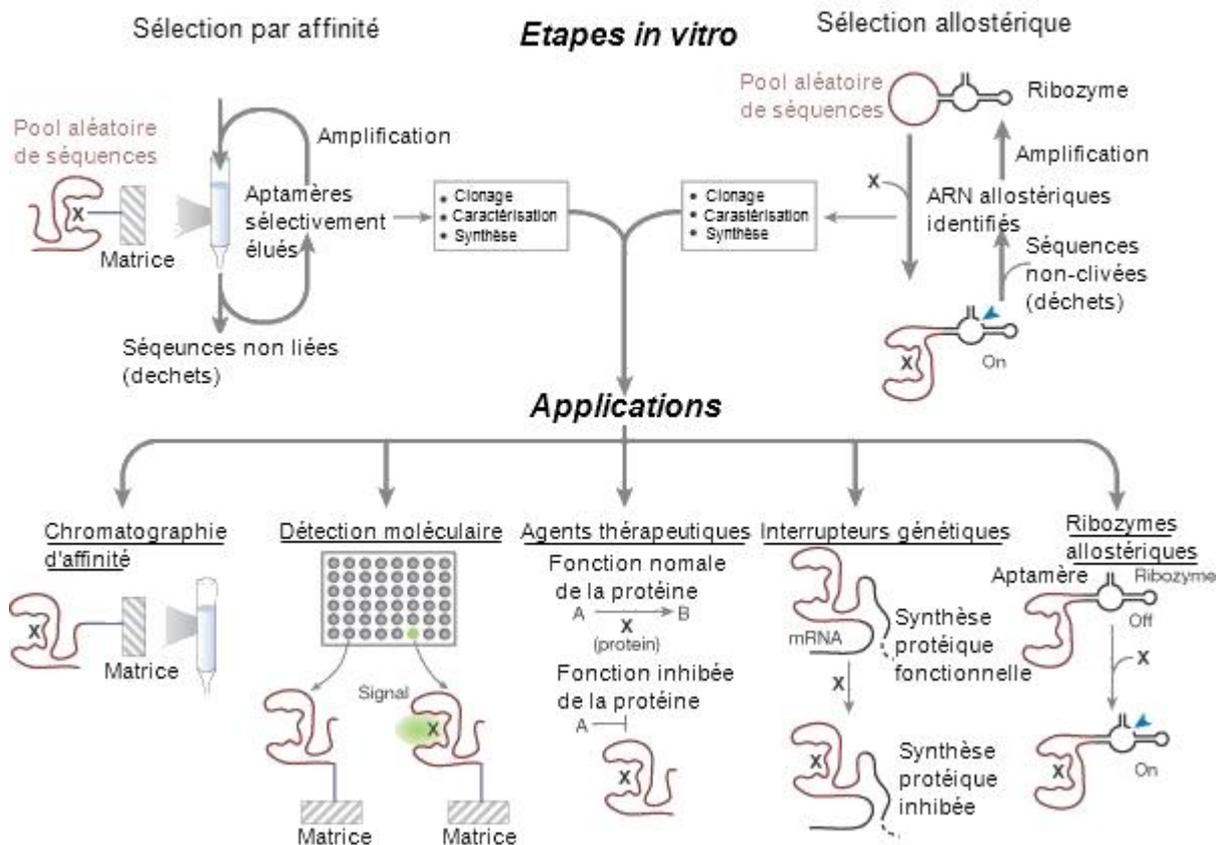


Figure 73 : Génération et applications des aptamères. (Breaker, 2004)

4.3.3 - INTERFERENCE ARN

L'interférence ARN (ARNi) est considérée par beaucoup comme LA troisième génération d'antisens. S'il est indéniable que les avancées promises et/ou réalisées grâce à cette méthode sont importantes et qu'elles ont insufflées une nouvelle dynamique et crédibilité aux approches antisens (Dorsett et Tuschl, 2004), c'est une discipline encore très jeune.

On peut cependant penser qu'elle bénéficiera de l'expérience sur les antisens, ce qui devrait permettre des applications plus rapides. Le rapprochement entre Isis Pharma (l'entreprise de référence sur les antisens) et Alnyan (spécialiste des ARNi) montre, s'il en était besoin, cette filiation (Winkler, 2004).

4.3.3.a - PRINCIPES DE FONCTIONNEMENT DES ARNi

L'interférence ARN, qualifié par la revue Science de décembre 2002 comme la « percée scientifique de l'année 2002 » représente un formidable espoir dans le développement de thérapies basées sur une approche antisens (Couzin, 2002).

Les premiers indices de l'existence d'une interférence ARN remontent à l'année 1990 et l'observation chez le pétunia d'un phénomène de « cosuppression » d'un phénotype (couleur rouge des feuilles) après transfection d'un plasmide exprimant un gène pourtant homologue au gène cellulaire (Napoli *et al.*, 1990). Des observations du même ordre ont été réalisées chez des procaryotes (Romano et Macino, 1992). Le mécanisme moléculaire de l'interférence ARN a commencé à être décrit en 1998 avec l'identification d'un petit ARN double brin (ARNdb) responsable des phénomènes d'extinction spécifique de gènes chez le nématode (Fire *et al.*, 1998). La découverte en 2001 de l'enzyme « dicer » qui coupe les ARNdb en siRNA, small interfering ARN, a marqué l'envol de l'intérêt pour l'interférence ARN (Bernstein *et al.*, 2001).

On a depuis mis en évidence à plusieurs niveaux l'importance de l'interférence ARN dans tous les organismes vivants au niveau de la régulation épigénétique (Sun et Allis, 2002). C'est une piste suivie pour expliquer l'extinction des centrosomes (Volpe *et al.*, 2002), les gènes d'empreinte (Sleutels *et al.*, 2002) ou encore la protection de l'ADN en empêchant le mouvement des transposons (Klahre *et al.*, 2002). Une interférence ARN interviendrait également au niveau du contrôle de la division cellulaire (Martin *et al.*, 1991). Des pathologies comme celle de l'X fragile pourraient s'expliquer par une déficience en une des enzymes du système (Caudy *et al.*, 2002).

4.3.3.b - APPLICATIONS DE L'INTERFERENCE ARN

En dehors de l'identification des processus impliquant une interférence ARN, l'intérêt des siRNA réside dans la possibilité que l'on a d'utiliser ce mécanisme pour aller éteindre spécifiquement et à un moment choisi un gène.

L'introduction dans une cellule d'un petit ARNdb entraîne sa prise en charge par le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*) et l'extinction spécifique du gène cible. Il est également possible de réaliser des plasmides où on a une séquence inversée répétée d'ADN qui une fois transcrite donne une boucle d'ARN (*shRNA pour short hairpin RNA*), reconnue par l'enzyme Dicer et qui permet d'éteindre un gène cible (Figure 74).

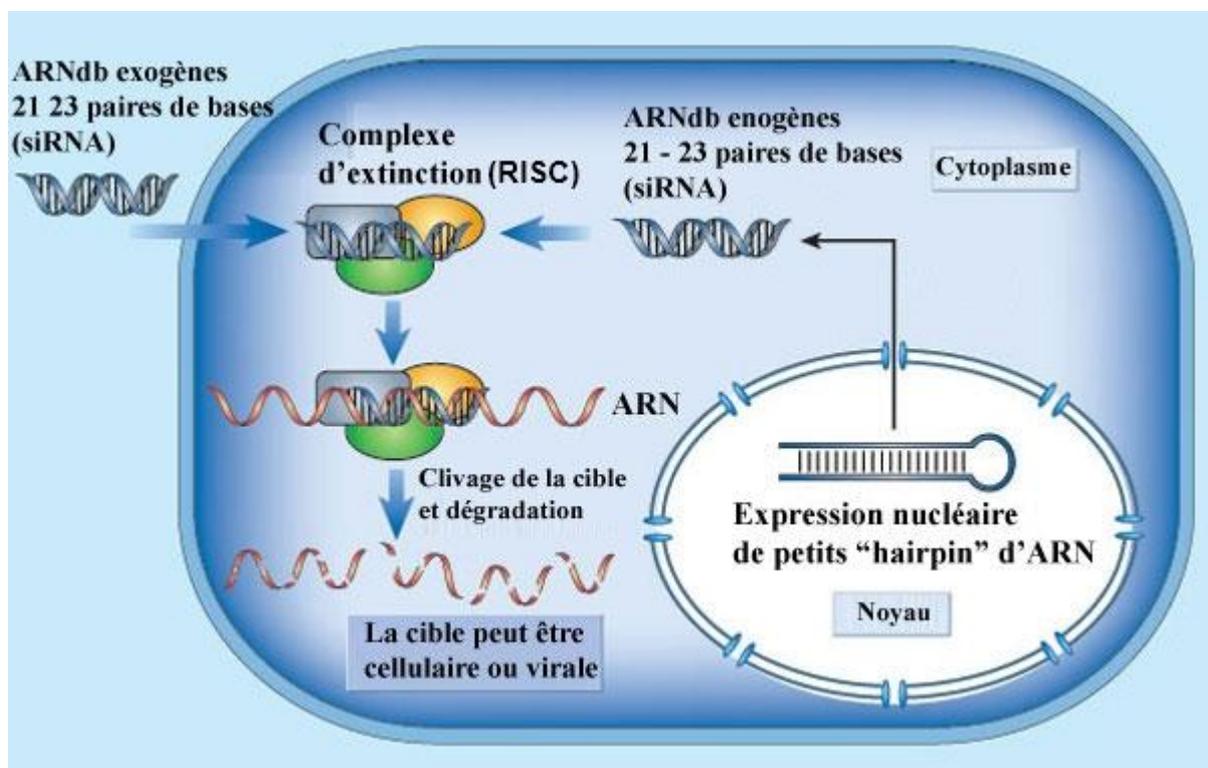


Figure 74 : Utilisation de l'interférence ARN comme stratégie antisens. (Carmichael, 2002)

La possibilité de réaliser à moindre coût des organismes Knock Out par cette méthode est une avancée remarquable. L'étude du nématode a beaucoup progressé *via* cette nouvelle technique puisqu'il suffit de « baigner » l'organisme dans une solution contenant des ARNdb pour qu'il y ait extinction du gène cible.

Aujourd'hui, la question concernant les ARNi est de savoir s'ils pourront révolutionner les traitements des maladies humaines de la même façon qu'ils ont révolutionnés la recherche génétique fonctionnelle fondamentale (Hannon et Rossi, 2004). Des limitations existent déjà et seront exposées dans le cas des approches contre le VHC page 102.

B - APPLICATION AU VHC DES APPROCHES ANTISENS

Dans le cas du VHC, beaucoup d'alternatives thérapeutiques sont actuellement en essais cliniques comme nous l'avons montré dans la partie sur les traitements (p. 74). Il est cependant très probable qu'à terme, **l'apparition de résistances** freine leur utilisation. Il est donc important d'explorer de nouvelles options pour la thérapie VHC, en particulier celles qui pourraient s'affranchir des résistances comme les approches de type antisens dont nous venons de dresser un aperçu. Des ODN antisens, des ribozymes, aptamères et siRNA sont en développement (Figure 75).

On peut distinguer deux catégories d'inhibition : une inhibition avec blocage de la traduction (en orange) et une inhibition avec clivage de l'ARN (en bleu).

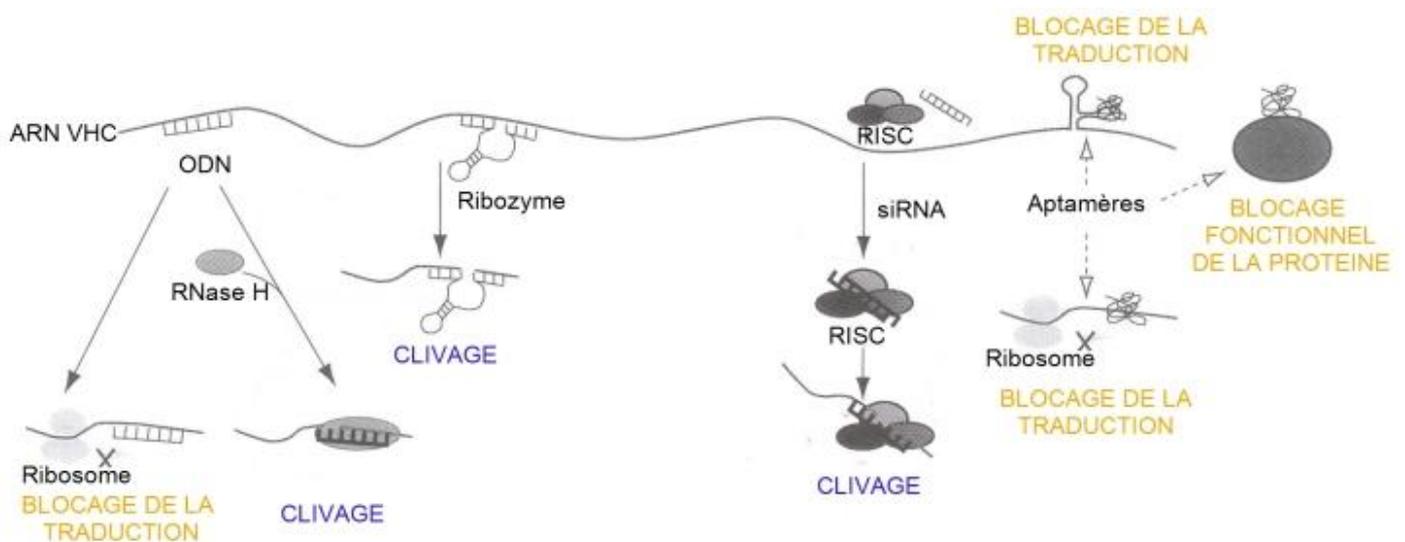


Figure 75 : Mécanismes principaux d'action des stratégies antisens sur le VHC. (Trepanier *et al.*, 2006b)

Pour que ces approches soient efficaces, il faut tout d'abord déterminer quelle zone doit être ciblée. Comme nous l'avons évoqué ailleurs, le VHC peut être sous plusieurs génotypes avec des variations importantes de séquence. Des analyses informatiques ont montré que la partie 5'UTR était la plus conservée (Figure 76). Trois domaines sur les quatre que compte la région 5'UTR constituent la région IRES, illustrée à la page 40. La région 3'UTR, illustrée page 42, est également peu variable.

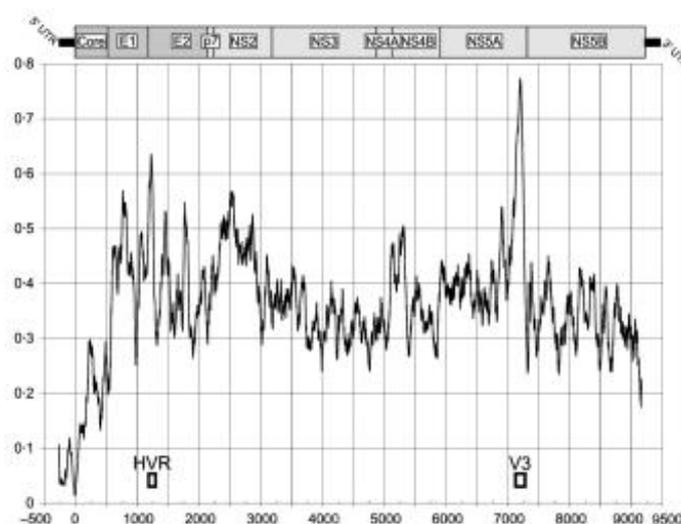


Figure 76 : Représentation en diagramme du VHC montrant la diversité du génome entre les génotypes. (Simmonds, 2004a)

1 - INHIBITION AVEC BLOCAGE DE LA TRADUCTION

Une première possibilité serait de bloquer la traduction, soit par fixation d'**ODN antisens** sur l'ARN, soit par blocage des protéines virales ou du transcrit ARN par des **aptamères**.

1.1 - PHOSPHOROTHIOATES ET DERIVES

L'inhibition de la réplication du VHC par des ODN antisens peut en théorie éliminer le virus de la cellule puisque son cycle de réplication dépend entièrement de l'ARN (Moradpour et Blum, 2004). Le fait par contre que la réplication du VHC se produise dans le cytoplasme et que la RNase-H soit localisée majoritairement dans le noyau conduit à envisager une action des antisens non pas *via* la RNase-H mais par **blocage stérique de la traduction**.

Beaucoup d'ODN ont été dirigés contre la **boucle III_d** et conduisent à la perturbation de la transcription et de la réplication par déstabilisation de la fixation du cofacteur eIF3 (Alt *et al.*, 1995; Kieft *et al.*, 1999; Lukavsky *et al.*, 2000; Martinand-Mari *et al.*, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Wu et Wu, 1998). La région du **domaine II** qui contient une partie riche en pyrimidines et la région du codon initiateur AUG dans le **domaine IV** ont également été ciblées (Alt *et al.*, 1999b; Alt *et al.*, 1997; Hanecak *et al.*, 1996; McCaffrey *et al.*, 2003; McHutchison *et al.*, 2006; Mizutani *et al.*, 1995; Seki et Honda, 1995b; Vidalin *et al.*, 1996b; Wakita et Wands, 1994a; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999). D'autres cibles ont été envisagées, mais avec des résultats en général moins bons, en particulier la **séquence codant la protéine de capsid** (Basu *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2005; Wakita et Wands, 1994a), la **séquence codant NS3** (Heintges *et al.*, 2001), et la **région X en 3'UTR** (Smith *et al.*, 2002). Un seul candidat est en phase clinique, **ISIS 14803**, mais son développement est en suspens à la fois pour des raisons d'efficacité et de toxicité. Sur 28 patients en phase II d'essais cliniques, 3 seulement ont vu baisser de façon significative les quantités d'ARN du VHC et 5 ont eu une augmentation importante des ALAT (McHutchison *et al.*, 2006).

Au niveau du type d'antisens utilisés, la plupart sont des PS-ODN ou des 2'O Me MBO. Une équipe a présenté des résultats d'inhibition avec des Morpholinos (McCaffrey *et al.*, 2003) et une autre avec des LNA et PNA (Nulf et Corey, 2004a). Notre travail présenté dans les études 2 & 3 porte sur cette dernière approche.

1.2 - RNA APTAMERES

Plusieurs études ont été menées avec des aptamères dirigés contre des protéines ou l'ARN dans de nombreuses maladies, dont le VHC (Cerchia *et al.*, 2002; Toulme *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004). Des études ont montré qu'ils pouvaient reconnaître et se lier à la polymérase NS5B, à la protéine NS3, aux régions UTR et inhiber les fonctions enzymatiques ou bloquer la réplication *in vitro* et en culture de cellules (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Bellecave *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004; Fukuda, 2000; Hwang *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2000a; Hwang *et al.*, 2000b; Kakiuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.*, 2003; Romero-Lopez *et al.*, 2005; Sekiya *et al.*, 2003; Toulme *et al.*, 2003; Umehara *et al.*, 2005; Urvil *et al.*, 1997; Vo *et al.*, 2003).

Des essais cliniques sont en prévision avec les molécules ayant montré une efficacité intéressante (Kakiuchi *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2003).

2 - INHIBITION AVEC CLIVAGE

Une autre approche pourrait consister à aller cliver l'ARN du VHC, ce qui rendrait impossible la traduction et entraînerait sa dégradation par les nucléases. Deux possibilités sont alors envisageables : les **ribozymes** et les **siRNA**.

2.1 - RIBOZYMES

L'avantage des ribozymes par rapport aux ODN antisens est qu'ils peuvent cliver par eux même le transcrit, sans RNase H qui, de toute façon, est très peu présente dans le cytoplasme. La plupart des ribozymes développés ciblent les régions 5'UTR et 3'UTR (Guo *et al.*, 2003a; Kruger *et al.*, 2001; Nadal *et al.*, 2003; Ryu et Lee, 2004; Sabariego *et al.*

al., 2004; Sakamoto *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2004). Des séquences reconnues par certains ribozymes étant présentes dans la séquence de la protéine de capsid (Ludwig *et al.*, 1998; Sabariego *et al.*, 2004; Welch *et al.*, 1996) et dans des régions conservées de l'ARN brin positif et brin négatif pourraient également être envisagées comme cibles pour réduire l'ARN viral (Lieber *et al.*, 1996; Welch *et al.*, 1998).

En 2001, un ribozyme (Heptazyme™ - Ribozyme Pharma) a été le premier anti-VHC à terminer une phase II d'essais cliniques (Kashani-Sabet, 2002; Sandberg *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 1998). Ce ribozyme qui cible la région 5'UTR était bien toléré chez les individus sains et a démontré un effet bénéfique chez 10% des patients (Source : internet). A cette époque, ces résultats paraissaient encourageants et certains parlaient déjà d'une association avec l'IFN- α . Cependant ces espoirs ont vite été dissipés avec un cas d'animal devenu aveugle après traitement avec la molécule.

Une autre classe de ribozymes, des **désoxyribozymes** peut également présenter un intérêt dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques anti-VHC. Ils ont été identifiés dans un processus analogue à celui utilisé pour les aptamères, à partir de bibliothèques d'ADN sélectionnées sur leur capacité à cliver une cible d'ARN (Santoro et Joyce, 1998). Certains sont en phase pré-clinique contre le cancer (Wu *et al.*, 1999), ou contre des maladies d'origines virales comme le VIH, le VHB ou le virus de la grippe (Chakraborti et Banerjee, 2003; Goila et Banerjee, 2001; Oketani *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2004).

Cette technologie a été testée *in vitro* et en culture de cellules contre le VHC. Des composés dirigés contre la région 5'UTR du virus ont permis des diminutions de 45-67% des quantités d'ARN (Oketani *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003). La région codant la protéine de capsid peut aussi se révéler une cible d'intérêt (Trepanier *et al.*, 2006a).

2.2 - siRNA

L'approche siRNA est une approche qui séduit beaucoup d'équipes travaillant sur le VHC. La capacité de ces molécules à éliminer l'ARN du VHC en culture cellulaire a été montrée et l'étude de son application en thérapie est à l'étude. Les premières études utilisant des siRNA reconnaissant la région **NS5B** ont montré une diminution de 75% d'un signal luciférase lorsqu'un ARN chimérique NS5B-luciférase était exprimé dans une **souris** (McCaffrey *et al.*, 2002). Une étude plus récente qui utilise des **shRNA dirigés contre l'IRES** a permis d'obtenir une réduction de l'activité luciférase dirigée par l'IRES de 94-98% (Wang *et al.*, 2005b). D'autres études ciblant la région 5'UTR, 3'UTR, la région codant la capsid, E2, NS3, NS4B ou NS5A/B ont montré une **réduction de plus de 80 fois de la quantité d'ARN** (Kanda *et al.*, 2006; Kronke *et al.*, 2004; Prabhu *et al.*, 2005; Radhakrishnan *et al.*, 2004; Randall et Rice, 2004; Sen *et al.*, 2003; Takigawa *et al.*, 2004) et une **élimination de 98% des cellules infectées** (Randall et Rice, 2004).

Les siRNA sont cependant extrêmement spécifiques et l'apparition de mutations de un ou plusieurs nucléotides abolit leur activité. Une étude a d'ailleurs montré qu'une construction très active contre la séquence codant NS5B devient inefficace à cause d'apparition des mutations ponctuelles au niveau de la région ciblée (Wilson et Richardson, 2005). Enfin, les démonstrations s'accumulent pour montrer que l'interférence ARN est une voie de défense ancestrale des organismes. Cela implique alors que l'évolution a sélectionné des organismes capables de lutter contre le siRNA. Dans le cas du VIH et du virus de la grippe, il a déjà été montré que certaines protéines virales supprimaient les siRNA ou empêchaient le fonctionnement correct de l'enzyme clef du système, DICER (Bennasser *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Lu et Cullen, 2004). La protéine de capsid du VHC semblerait également avoir cette fonction (Wang *et al.*, 2006).

Au final, malgré des avantages indéniables, les siRNA se révèlent problématiques dans une optique thérapeutique. La faible toxicité de ces molécules est certainement un avantage mais l'apparition prévisible de mutants échappatoires ou la suppression de l'interférence par certaines enzymes virales pose le problème de la pertinence de l'approche (Gitlin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002).

C - UN ANTISENS PARTICULIER : LES PEPTIDE NUCLEIC ACIDS (PNA)

Les « Peptide Nucleic Acid » ou **PNA** ont été identifiés il y a 15 ans comme ODN de deuxième génération (Nielsen *et al.*, 1991). C'est un dérivé nucléotidique qui présente de nombreux intérêts par sa structure et ses caractéristiques. Les études 2 et 3 que j'ai conduites au cours de mon travail de doctorat portant sur ces composés, j'ai choisi de le développer davantage dans cette dernière partie des données bibliographiques.

1 - GENERALITES

1.1 - STRUCTURE

Les PNA sont des analogues structuraux de l'ADN dans lesquels la liaison phosphodiester a été remplacée par une liaison de type peptidique non chargée. Les bases sont attachées par des liaisons méthylène-carbonyl à une glycine. Les PNA ressemblent donc à des peptides puisque l'on a des extrémités N-terminale et C-terminale et un motif répété N-(2-aminoéthyl)-glycine (Figure 77). En dépit de cette structure entièrement nouvelle et complètement synthétique, les PNA sont capables de se lier à l'ADN ou à l'ARN de manière séquence spécifique en obéissant aux lois de l'appariement des bases décrit par Watson et Crick (Nielsen *et al.*, 1991).

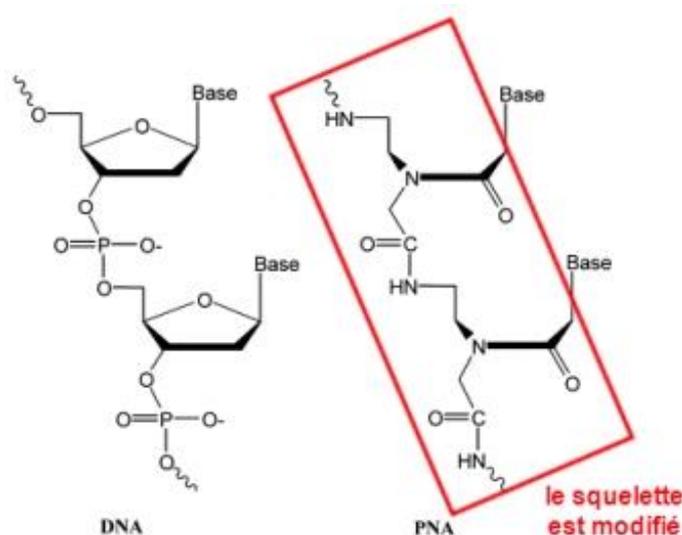


Figure 77 : Comparaison des structures chimiques des PNA et de l'ADN. (Lundin *et al.*, 2006)

1.2 - CARACTERISTIQUES

Les PNA sont des molécules **neutres** et relativement **hydrophobes**. En solution aqueuse, la solubilité est moyenne (Noble *et al.*, 1995) et les PNA ont tendance à s'agréger ensemble (Leijon *et al.*, 1994). Si l'on ajoute de l'ADN ou de l'ARN, les agrégats se dissolvent et s'associent en structures complexes bien définies. En général des groupements lysines (ou d'autres acides aminés chargés) sont ajoutés aux PNA, ce qui réduit considérablement la formation d'agrégats et les problèmes de solubilité (Lundin *et al.*, 2006).

Les PNA ont été au départ destinés à se lier en temps que troisième brin à l'ADN double brin, dans l'objectif de modifier sa transcription. Il est cependant rapidement apparu que les **PNA pouvaient se fixer de plusieurs façons sur l'ARN et l'ADN**. Selon les conditions expérimentales et les séquences, ils ont la possibilité de se lier aux acides nucléiques en formant une liaison simple, un triplex avec la double hélice d'ADN (avec ou sans invasion), formant ainsi des liaisons de Hoogsteen, comme illustré par la Figure 78. Ces complexes sont en général plus stables à une température donnée que les complexes d'acides nucléiques correspondants, particulièrement si la force ionique est faible (Dueholm *et al.*, 1994). La liaison des PNA aux ARN n'est pas toujours prévisible pour des raisons de conformation et le complexe formé n'est pas un substrat de la RNase H (Knudsen et Nielsen, 1996a).

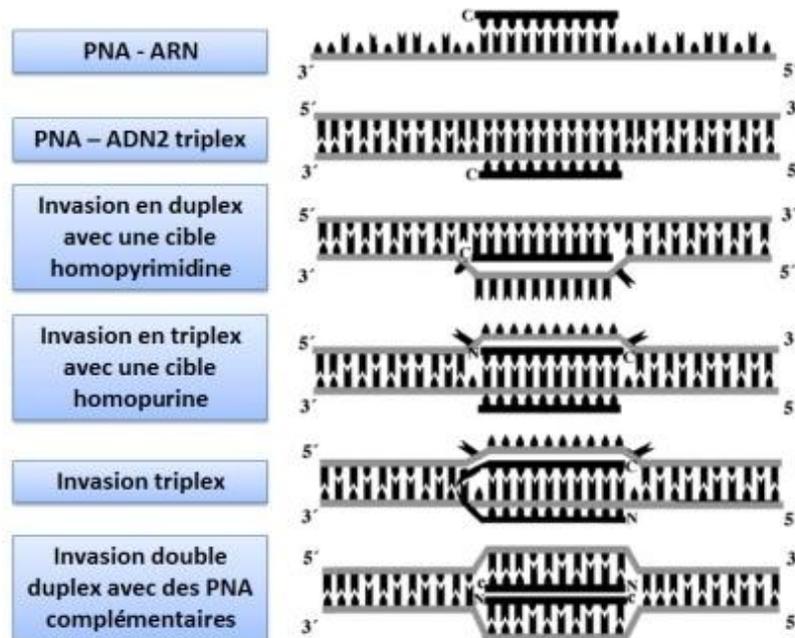


Figure 78: Modèles de liaison des PNA aux doubles hélices et à l'ARN. (Lundin *et al.*, 2006)

Les PNA sont enfin **résistants à la dégradation enzymatique** (nucléases, protéases ou peptidases) du fait de leur structure chimique hybride (Demidov *et al.*, 1994) et **ne se lient peu ou pas aux protéines du sérum**. Ces deux propriétés permettent de surmonter deux des obstacles majeurs rencontrés avec l'utilisation des oligonucléotides classiques dans les applications biologiques.

1.3 - MODE D'ACTION DES PNA

On distingue deux modes d'actions des PNA, une action de type « antigène » par reconnaissance directe de l'ADN et une action « antisens » par localisation du PNA sur les transcrits ARN et blocage de la traduction (Figure 79).

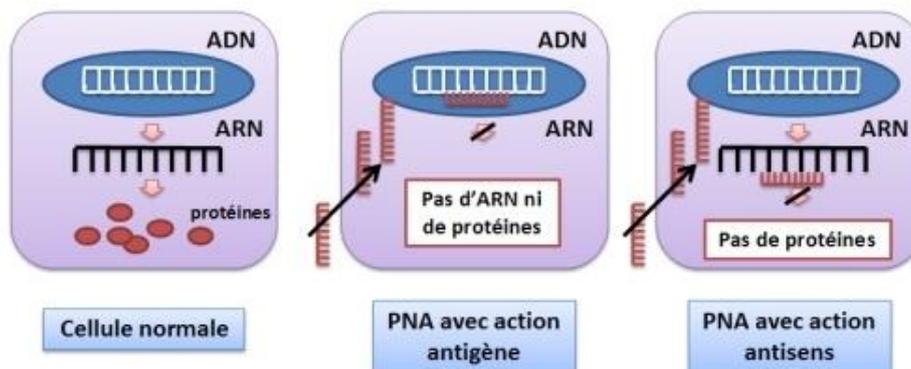


Figure 79 : Stratégies d'utilisation des PNA.

ACTION « ANTISENS »

Comme la majorité des ODN antisens de deuxième génération, les PNA ne sont pas le substrat de la RNase H (voir p. 88), et agissent par **blocage stérique de l'ARN cible** (Good et Nielsen, 1997). Ce blocage est particulièrement efficace lorsqu'ils sont dirigés contre le codon d'initiation AUG (Knudsen et Nielsen, 1996b). Il n'a jamais été montré d'activation de nucléases ou du complexe RISC par un complexe PNA - ARN. Les PNA ont la particularité d'avoir un squelette très flexible ; ils peuvent donc se fixer sur des ARN structurés (Beck, 2002; Brown *et al.*, 1994; Dias *et al.*, 2002). De manière intéressante, on retrouve ces régions structurées en particulier dans les régions de type IRES impliquée dans l'initiation de la traduction. **Les IRES sont donc des cibles sensibles à l'inhibition par les PNA** (Doyle *et al.*, 2001).

Pour obtenir une reconnaissance maximale, il faut qu'il y ait **co-localisation du PNA avec sa cible**. Peu de choses sont connues à ce sujet. Des études de fluorescence ont montré que les PNA ont tendance à s'accumuler dans les endosomes (Folini *et al.*, 2003; Gray *et al.*, 1997). D'autres études ont cependant mis en évidence une inhibition d'ARN cytoplasmique avec des PNA et une accumulation dans le noyau a été observée (Bonham *et al.*, 1995b; Folini *et al.*, 2003). Cela peut être donc une limitation pour l'utilisation de PNA à visée antisens.

ACTION « ANTIGÈNE »

La capacité des PNA à réaliser des invasions d'ADN double brin a ouvert la possibilité d'interférer directement avec la régulation des gènes. La formation de triples hélices (PNA)₂-ADN nécessite des **PNA homopyrimidines**. Ces complexes sont extrêmement stables ($T_m > 70^\circ\text{C}$) car le PNA qui s'apparie au double-brin d'ADN a la particularité de déplacer le brin homopyrimidine d'ADN (Nielsen *et al.*, 1991). Les complexes les plus stables ont été observés par des PNA s'hybridant d'une part par des liaisons de **Watson & Crick** en orientation antiparallèle et d'autre part par des liaisons de **Hoogsteen** en orientation parallèle par rapport à l'ADN (Knudsen et Nielsen, 1997) comme illustré par la Figure 80.

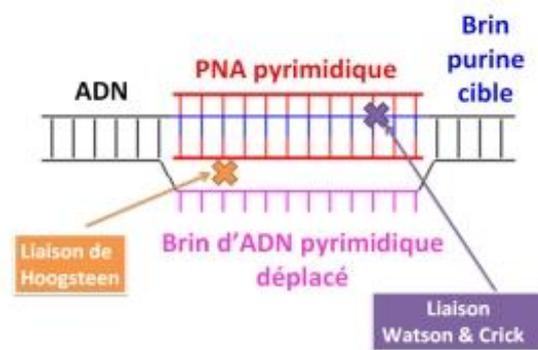


Figure 80 : Représentation schématique du déplacement du double brin d'ADN par un PNA homopyrimidique via les liaisons hydrogène de Watson & Crick et de Hoogsteen.

La seule limite à prendre en compte est **l'accès à l'ADN** dans la chromatine en conditions physiologiques. Comme nous le verrons par la suite, cette limite n'est que relative et encore une fois bien moins importante que les problèmes liés à la pénétration en cellules.

2 - UTILISATION DES PNA COMME « OUTIL » DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les PNA sont utilisés dans de nombreuses applications de diagnostic qui tirent partie de la capacité des PNA à se lier aux acides nucléiques naturels de manière **indépendante de la concentration en sels**.

D'autres applications exploitent le fort **pouvoir discriminant** des PNA. En effet, l'apparition d'un unique mésappariement entraînera une baisse significative de la fixation du PNA à sa cible. Des équipes ont développé des techniques d'identification de polymorphisme portant sur un seul nucléotide ou des sondes PCR (Kuhn *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2001). De la même façon, la localisation *in situ* de gènes spécifiques sur les chromosomes par fluorescence est possible en utilisant des PNA couplés à un fluorochrome (Pellestor *et al.*).

De nombreuses autres applications utilisent des PNA. Pour une revue complète, voir (Lundin *et al.*, 2006).

3 - APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DES PNA

Le potentiel antisens et antigène des PNA font de ces composés des molécules de choix pour de nouvelles approches thérapeutiques basées sur les antisens. Parmi tous les travaux publiés, voilà un aperçu des résultats obtenus contre des gènes cellulaires, des bactéries et en virologie.

Les premiers résultats démontrant l'efficacité des PNA *in vivo* ont été obtenus chez un rat où des PNA ciblaient des récepteurs neuronaux (Tyler *et al.*, 1998). Depuis des inhibitions antisens ont été réalisées contre de nombreux gènes cellulaires : contre l'oncogène **mdm2** (Shiraishi et Nielsen, 2004), l'**IL-5R α** (Karras *et al.*, 2001), un isoforme de la **cavéoline-1** (Liu *et al.*, 2004), le **récepteur à CXCR3** qui est supposé jouer un rôle important dans les rejets de greffe (Jiankuo *et al.*, 2003), le gène du **récepteur à la galamine** (Pooga *et al.*, 1998), la protéine précurseur de l'**amyloïde** (Boules *et al.*, 2004), un **récepteur du glutamate** (Rembach *et al.*, 2004), etc...

Des PNA ont permis d'inhiber la croissance bactérienne en ciblant des gènes essentiels à leur croissance dans **E. Coli** ou dans **Staphylococcus Aureus** (Good *et al.*, 2001; Nekhotiaeva *et al.*, 2004).

En **virologie**, les PNA pourraient se révéler des agents antiviraux très intéressants vu que la majorité des virus qui sont à l'origine de problèmes médicaux sont des virus à ARN (Moya *et al.*, 2004). De plus, même des virus à ADN utilisent une initiation de la traduction via un IRES qui a été montré comme étant une cible adaptée aux PNA (Doyle *et al.*, 2001). Dès la découverte des PNA, des études ont montré qu'il était possible d'inhiber l'**élongation de matrice ARN par les transcriptases-inverses virales** (Hanvey *et al.*, 1992; Rasmussen *et al.*, 2006). En ciblant des structures ARN bien définies, conservées et essentielles au virus, de nombreuses équipes ont montré que les PNA pouvaient inhiber la réplication virale *in vitro* et dans des modèles cellulaires. Par exemple, des PNA ont été dirigés contre les séquences de dimérisation et de transcription du **VIH**, notamment contre la boucle TAR (Chaubey *et al.*, 2005; Mayhood *et al.*, 2000; Patino *et al.*, 2002; Riguet *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2005) ou la région RRE (Kumagai *et al.*, 2001). Des travaux conduits au sein du laboratoire ont permis de montrer que des PNA dirigés contre le signal d'encapsidation de l'ARN prégénomique du **VHB** du canard (un modèle d'étude du VHB) ont un effet inhibiteur (Robaczewska *et al.*, 2005).

Ces résultats confirment l'efficacité des PNA bien que des difficultés notables de pénétration dans les cellules de mammifères ralentissent les applications *in vivo* (Bonham *et al.*, 1995a). L'identification de peptides d'une dizaine d'acide aminés qui, conjugués aux PNA, peuvent augmenter la pénétration cellulaire permet toutefois d'obtenir des rendements acceptables (Pooga *et al.*, 1998).

4 - LE PROBLEME DE LA PENETRATION CELLULAIRE

Comme pour beaucoup de molécules bioactives, la pénétration et l'adressage dans les cellules reste un frein majeur. Dans le cas des PNA, ce problème est amplifié en raison notamment de leur grande taille et de leur absence de charge (Demidov *et al.*, 1994; Nielsen, 1999). Leur faible solubilité dans l'eau est également un frein, bien que des couplages simples, l'ajout d'une lysine par exemple, permette d'améliorer ce paramètre (Gambari, 2001). Des études sur le transport des PNA ont montré que 6 à 7 fois moins de PNA pénétrait comparé à des ODN conventionnels, et qu'à peine 20 % étaient localisés dans le noyau (Gray *et al.*, 1997). Plusieurs méthodes ont alors été proposées afin d'améliorer la pénétration intracellulaire. Deux pistes sont possibles : rechercher de **nouvelles méthodes permettant l'entrée de molécules non modifiées** ou **apporter des modifications aux PNA**.

4.1 - MOLECULES NON MODIFIEES

Bien que peu efficace, la pénétration des PNA non modifiés *in vitro* dans des cultures cellulaires et *in vivo* a été démontrée par de nombreuses études (Lundin *et al.*, 2006). L'inconvénient majeur de l'utilisation de PNA non modifiés, si elle est envisagée dans une application clinique, est la nécessité d'utiliser de **grandes concentrations** afin d'avoir un effet antisens ou antigène. Cela peut conduire à augmenter le risque de toxicité mais également à

induire des effets non spécifiques (Adlerz *et al.*, 2003). Plusieurs méthodes permettant d'améliorer l'internalisation des PNA ont été proposées, diminuant ainsi les risques de toxicité.

L'ÉLECTROPORATION

C'est l'une des méthodes les plus efficaces pour le transfert des PNA dans les cellules. Elle a été utilisée avec succès dans plusieurs études : un PNA anti-téломérase a montré une action dans des fibroblastes transformés par le SV40 (Shammas *et al.*, 1999), un autre a permis de moduler l'épissage spécifique alternatif et constitutif de l'ARN pré-messager du récepteur de l'interleukine-5 murin (Karras *et al.*, 2001), dans les cellules érythroleucémiques humaines. L'initiation de la transcription du gène de la γ -globine a été inhibée par des PNA (Wang *et al.*, 1999).

De même, l'électroporation ne fonctionne qu'avec de grosses quantités PNA. Une approche de co-transfection du PNA non modifié avec une séquence d'ADN partiellement complémentaire semble une alternative intéressante mais n'est pas envisageable en vue d'une application thérapeutique.

LA CO-TRANSFECTION AVEC L'ADN

En complexant des PNA avec une séquence d'acide nucléique simple brin (ARN ou ADNsb) partiellement complémentaire, l'utilisation de méthodes classiques de transfection avec des lipides cationiques devient possible. De même, il est envisageable de charger des liposomes sur la base des interactions électrostatiques entre l'ADN (chargé positivement) et les chaînes d'acides-gras du liposomes (chargées négativement) (Gambari, 2001; Nastruzzi *et al.*, 2000; Scarfi *et al.*, 1999). Les liposomes représentent un système de distribution des PNA très avantageux car ils sont capables de protéger l'acide nucléique contre les processus de dégradation (Gursel *et al.*, 2001). Ils peuvent également être dirigés vers des tissus ou cellules spécifiques par conjugaison à des vecteurs appropriés tels que les anticorps monoclonaux (Koning *et al.*, 2001).

Il a été montré que des PNA ainsi complexés sont plus facilement internalisés par les cellules. De plus, les chimères ADN/PNA sont capables de stimuler l'activité RNase H *via* la séquence d'ADN conduisant à un clivage spécifique de l'ARNm cible dans la région ARN-DNA du duplex formé (Uhlmann, 1998). Récemment, ces chimères ADN/PNA ont été démontrées comme étant la meilleure solution, devant les PNA modifiés, pour permettre l'entrée des composés dans le noyau (Rasmussen *et al.*, 2006). Le seul obstacle à leur utilisation est qu'il faut trouver une séquence d'ADN suffisamment complémentaire pour permettre l'entrée mais pas trop pour éviter que le PNA n'y reste fixé, ce qui le rendrait inactif. Des études de longs PNA dirigés contre l'IRES du VHC ont montré ce problème (Nulf et Corey, 2004a).

METHODES ALTERNATIVES

D'autres méthodes visant à améliorer l'entrée de PNA non modifiés ont été évaluées. La **micro-injection directe** dans les cellules a été réalisée avec succès contre la protéine antigène T du SV40 dans une lignée cellulaire dérivée des fibroblastes (Hanvey *et al.*, 1992). Il est également possible de **perméabiliser les cellules** avec la streptolydine-O pour faire entrer des PNA dans des cellules fibroblastiques de souris transgéniques (Faruqi *et al.*, 1998) ou dans les mitochondries de cellules de mammifères (Flierl *et al.*, 2003).

Récemment, deux nouvelles méthodes qui permettraient, à terme, l'utilisation thérapeutique des PNA non modifiés ont été proposées. Une première stratégie pourrait consister à **opsoniser des PNA de manière électrostatique** sur des microsphères de polymères spécifiquement conçues à cet effet (Figure 81). Cette stratégie a permis d'obtenir 98% de cellules dans lesquelles le complexe a pénétré et s'accompagne d'inhibitions très bonnes (Chiarantini *et al.*, 2005).

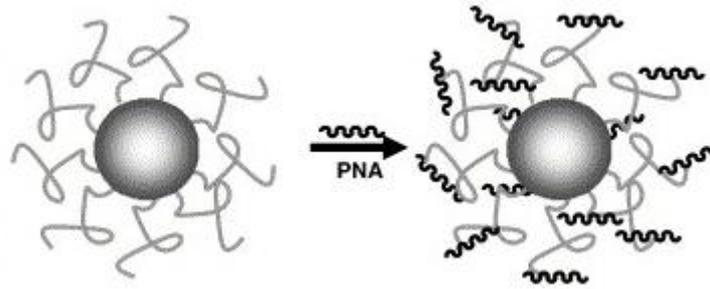


Figure 81 : Représentation schématique de la formation d'un complexe PNA/microsphère. (Chiarantini *et al.*, 2005)

Une autre stratégie consiste à charger des érythrocytes avec des PNA par une dialyse hypotonique puis à les relarguer de manière isotonique dans la cellule (Figure 82). Cette approche a permis d'obtenir un ciblage sélectif des macrophages et une inhibition très efficace de l'expression de la protéine iNOS (Chiarantini *et al.*, 2005).

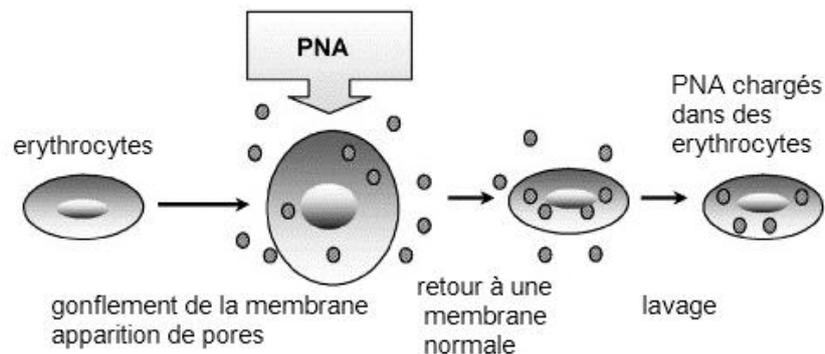


Figure 82 : Représentation schématique de la charge d'érythrocytes avec des PNA. (Chiarantini *et al.*, 2005)

4.2 - MODIFICATIONS DES PNA

Une autre possibilité pour améliorer la bio-distribution consiste à coupler le PNA avec un peptide qui favorise sa pénétration en cellule, ou CPP (*Cell Penetrating Peptide*). Des couplages avec des conjugués lipophiles ont également été proposés.

LES PEPTIDES DE PENETRATION EN CELLULE

Toute une classe de CPP a été décrite dans les dix dernières années (Fischer *et al.*, 2005). Ce sont en général des **peptides cationiques** avec un grand nombre d'arginines. Les exemples les plus courants sont le peptide **antennapedia**, la **pénétratine** ou le **peptide Tat du VIH**. Des arginines ou lysines seules ont également des propriétés de pénétration en cellule. Il a été initialement montré que ces CPP pénétraient dans la cellule via des mécanismes indépendants des récepteurs. Des résultats plus récents montrent que les CPP pénètrent par la voie des endosomes (Koppelhus *et al.*, 2002) ou par macro-pinocytose (Wadia *et al.*, 2004). Le défi est alors pour ces CPP de « s'échapper » des endosomes pour atteindre des cibles cytoplasmiques ou nucléaires, les endosomes étant également entourés par une double couche lipidique.

En effet, si la voie endosomale ne pose pas de problème pour les virus qui l'utilisent pour rentrer dans la cellule, c'est grâce à une protéine de fusion qui déstabilise les endosomes lorsque ceux-ci s'acidifient pour devenir des lysosomes. Ce n'est pas le cas des CPP, mais il a été montré récemment que la fusion d'un peptide Tat avec la protéine de fusion du virus influenza (HA2) augmentait significativement l'activité de la molécule couplée (Wadia *et al.*, 2004). Au final, le problème est qu'une telle construction a une taille de 32nt, ce qui ajouté à la longueur du PNA fait un peptide très long, difficile à synthétiser et dont l'utilisation thérapeutique paraît improbable (Nielsen, 2005).

Plusieurs études suggèrent toutefois la possibilité de réaliser des couplages avec de courts peptides de type **poly-arginine** (Nielsen, 2005) ou de type **hélice amphiphile** (Maier *et al.*, 2006). Dans cette dernière étude, l'efficacité

d'un PNA dirigé contre le transcrit du gène de CD40 en modèle murin, couplé à un **peptide de 10mer** réalisant une hélice amphiphile a pu être montré.

CONJUGUES LIPOPHILES

D'autres études ont permis de montrer que le couplage des PNA avec des conjugués lipophiles pouvait améliorer l'entrée des molécules *in vitro*. Des conjugaisons ont été réalisées avec l'**acide acétique adamantyle** (Ljungstrom *et al.*, 1999), l'**acridine** (Shiraishi et Nielsen, 2004), l'**acide décanoïque** (Bendifallah *et al.*, 2003), etc... Dans tous les cas, la pénétration a été améliorée mais l'action inhibitrice du PNA n'a pas toujours été démontrée.

Une stratégie récemment mise au point pourrait permettre des développements nouveaux (Filipovska *et al.*, 2004). Dans ce cas, **le PNA est conjugué à un cation lipophile, TPP (triphénylphosphonium)** par l'intermédiaire d'un pont disulfure (Figure 83-A). Le milieu extra cellulaire étant oxydant, ce type de composés présente une stabilité suffisante lors d'une utilisation thérapeutique. La charge portée par l'ensemble, en raison de la différence de potentiel au niveau de la membrane, permet la pénétration (Figure 83-B). A l'intérieur de la cellule, le milieu réducteur libère le PNA dans le cytoplasme où il pourra agir sur sa cible. A notre connaissance, il n'a cependant pas été publié à ce jour d'études *in vitro* ou *in vivo* utilisant cette méthode de conjugaison.

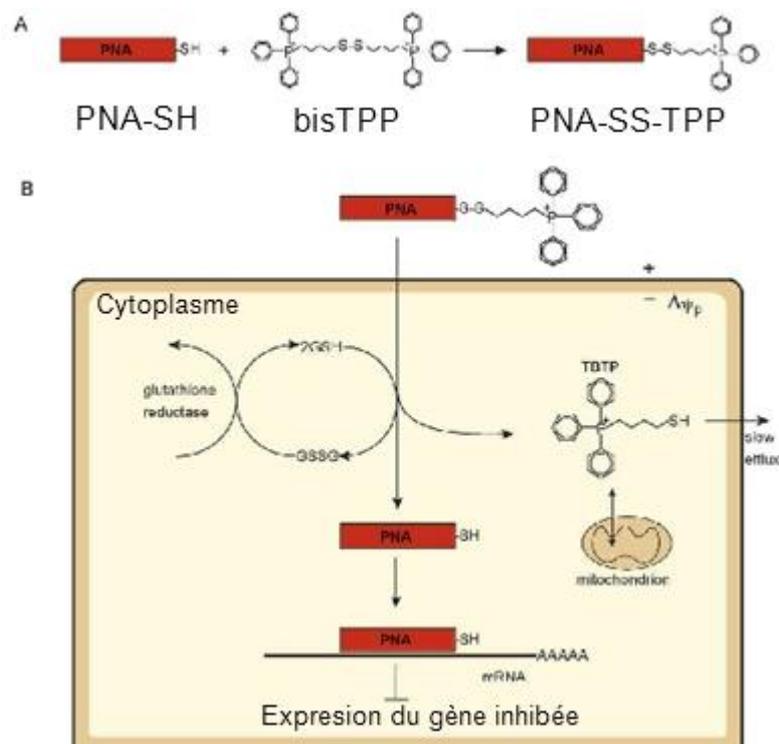


Figure 83 : (A) Couplage d'un PNA au TPP, une molécule lipophile (B) et modèle de pénétration dans la cellule. (Filipovska *et al.*, 2004)

Résultats et discussion

I - OBJECTIF DES TRAVAUX

Le virus de l'hépatite C représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique de part le nombre de personnes infectées dans le monde et le risque important de développement de maladies hépatiques, avec notamment le développement possible, 20 à 30 ans après l'infection, de carcinome hépatocellulaire.

Le traitement actuel, une combinaison entre l'interféron alpha-pégylé et la ribavirine permet d'obtenir de très bons résultats mais de manière inégale selon les génotypes du VHC infectant les patients. De plus, il présente de nombreux effets indésirables ce qui le rend difficile à tolérer.

Nos travaux s'inscrivent dans ce double constat :

- le **traitement actuel doit être amélioré** pour gagner en efficacité et en tolérance pour les patients.
- il est **indispensable d'anticiper le futur** en étudiant des stratégies capables de cibler le virus dans une région conservée et non sujette à modifications dans l'hypothèse d'apparition de résistances.

Trois études ont alors été conduites.

- La première étude a fait l'objet d'une publication intitulée « **Un nouvel interféron alpha variant possède une activité inhibitrice de la réplication du VHC de génotype 1 accrue dans le modèle du réplicon subgénomique, comparé à l'interféron α 2b utilisé en thérapie** ». Elle présente les résultats obtenus en étudiant des interférons alpha-variants isolés à partir d'études du polymorphisme naturel dans les gènes codant l'interféron-alpha. Une interféron intéressant, GEA007.1 a retenu notre attention pour ses propriétés et devrait poursuivre son développement *via* une collaboration avec la société GenOdyssee.
- La deuxième étude est soumise pour publication et s'intitule « **De courts *Peptide Nucleic Acids* (PNA) inhibent *in vitro* la traduction dépendante du site interne d'entrée du ribosome (IRES) du virus de l'hépatite C** ». Les résultats obtenus montrent que des antisens de deuxième génération de type PNA de 10mer de longueur ont une activité inhibitrice en ciblant spécifiquement la région IRES du VHC. Un composé, PNA-10 est particulièrement intéressant. Nos travaux montrent cependant la difficulté de travailler avec ce type de composés dans une optique thérapeutique.
- La dernière étude a fait l'objet d'une publication intitulée « **Un PNA cyclique ciblant le domaine IV de l'IRES du VHC inhibe *in vitro* la traduction IRES dépendante** ». Cette étude a été réalisée en parallèle avec la précédente et présente les résultats d'inhibition de la traduction IRES dépendante par un PNA cyclique. Cette étude valide le concept de la cyclisation de PNA courts et permet d'envisager d'autres développements de molécules.

II - ÉTUDE 1: INTERFERONS-ALPHA VARIANTS

Un nouvel interféron alpha variant possède une activité inhibitrice de la réplication du VHC de génotype 1 accrue dans le modèle du réplicon subgénomique, comparé à l'interféron α 2b utilisé en thérapie.

Vanessa Escuret^{1,2}, **Amaury Martin**^{1,2}, David Durantel^{1,2}, Romain Parent^{1,2}, Olivier Hantz^{1,2}, Christian Trépo^{1,2}, Thierry Menguy³, Emmanuel Bottius³, Jérôme Dardy³, Jean Maral³, Jean Louis Escary³, Fabien Zoulim^{1,2*}

¹ INSERM, U271, Laboratoire des virus hépatiques et pathologies associées, 151 cours Albert Thomas, 69003, Lyon, France

² Université Lyon 1, Faculté de Médecine Laennec, 69008, Lyon, France

³ GenOdyssee SA, 4 Rue Pierre Fontaine, 91085, Evry, France

Novel interferon alpha (IFN- α) variant with improved inhibitory activity against HCV genotype 1 replication compared to IFN- α 2b therapy, in a subgenomic replicon system

Publié en Dec. 2006 dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 50 No. 12 p.3984 – 3991

Novel Alpha Interferon (IFN- α) Variant with Improved Inhibitory Activity against Hepatitis C Virus Genotype 1 Replication Compared to IFN- α 2b Therapy in a Subgenomic Replicon System[▽]

Vanessa Escuret,¹ Amaury Martin,¹ David Durantel,¹ Romain Parent,¹ Olivier Hantz,¹
 Christian Trépo,¹ Thierry Menguy,² Emmanuel Bottius,² Jerome Dardy,²
 Jean Maral,² Jean Louis Escary,² and Fabien Zoulim^{1*}

INSERM, U271, Laboratoire des virus hépatiques et pathologies associées, 151 cours Albert Thomas, 69003 Lyon, and Université Lyon 1, Faculté de Médecine Laennec, 69008 Lyon, France,¹ and GenOdyssee SA, 4 Rue Pierre Fontaine, 91058 Evry Cedex, France²

Received 15 February 2006/Returned for modification 30 March 2006/Accepted 15 September 2006

Hepatitis C virus (HCV) treatment is based on the association of pegylated alpha interferon (IFN- α) and ribavirin. To improve the level of sustained virological response to treatment, especially in patients infected with HCV genotype 1, new IFNs with improved efficacy and toxicity profiles may be developed. In this report, we show that, in the BM4-5 cell line harboring an HCV subgenomic replicon, a novel and naturally occurring human IFN- α 17 variant, GEA007.1, which was discovered by using an original population genetics-based drug discovery approach, inhibits HCV genotype 1 RNA replication more efficiently than does IFN- α 2b. Moreover, we show that complete viral clearance is obtained in BM4-5 cells after long-term treatment with GEA007.1, while HCV subgenomic RNA is still detected in cells treated with other IFN- α variants or with standard IFN- α 2b. Eventually, we demonstrate that the better inhibitory activity of GEA007.1 compared to that of standard IFN- α is likely to be due to stronger and faster activation of the JAK-STAT signaling pathway and to broader expression of IFN- α -responsive genes in cells. Our results demonstrate a superior inhibitory activity of GEA007.1 over that of IFN- α 2b in the HCV replicon system. Clinical trials are required to determine whether GEA007.1 could be a potent “next generation” IFN for the treatment of HCV infection, especially in nonresponders or relapsing patients infected with HCV genotype 1 who currently represent a clinical unmet need.

Hepatitis C virus (HCV) infects 170 million people worldwide and leads, in approximately 70% of cases, to chronic infection (3, 24, 26). Current treatments are based on the association of pegylated alpha interferon (IFN- α) 2a or 2b and ribavirin (5, 8, 20). This treatment induces a sustained virological response in approximately 60% of cases. The rate of sustained virological response ranges from 30 to 40% in patients infected with genotype 1 to 80 to 90% in those infected with genotype 2 or 3. Despite rather good efficacy, this treatment is often poorly tolerated because of the side effects (5). It is therefore important to improve current molecules and continue searching for novel antiviral agents with an enhanced anti-HCV activity to overcome the failure of current treatments, especially in patients infected with HCV genotype 1 (4).

Until the very recent development of a complete and robust HCV replication system (19, 27, 28), hepatoma cell lines harboring the HCV subgenomic replicon were a relevant model for studying some aspects of HCV biology as well as the effects and mechanisms of action of antiviral agents against HCV replication (1). Various interferons, including IFN- α , - β , and - γ , were studied using this model, which thus provided some insight on their antiviral effects (6, 7, 10, 18) and mechanisms of action (6, 11, 12, 15). Overall it was shown that the trans-

duction pathway following the interaction of exogenous IFNs with their cellular receptors was functional in most cases, although slight differences could exist between different Huh7 cell lines harboring HCV subgenomic replicons. These differences may account for the variability observed in the amount of interferon used to obtain a given inhibition. Altogether, HCV replicon systems were validated as suitable tools for studying the efficacies and mechanisms of action of interferon molecules. Alpha interferon is known to exhibit several independent biological activities, including immunomodulatory, antiproliferative, and antiviral activities (14, 22, 23). In the context of an antiviral strategy, the pleiotropic effect of IFN- α may account for the adverse effects observed in vivo that are major causes of either noncompliance or premature interruption of the treatment (5). One possible approach to improving the currently used IFN- α is to identify novel IFN- α entities with increased antiviral activities and potentially decreased other activities.

In this study, we evaluated the inhibitory effects of original and functionally relevant variants of different IFN- α subtypes (IFNv) against the replication of the HCV using a cell line harboring a HCV genotype 1b subgenomic replicon (BM4-5 cells) and compared them to the inhibitory effect of standard IFN- α 2b (i.e., IFN- α 2 wild type [IFN- α 2WT]). One of the studied variants, GEA007.1, was found to be seven times more efficient than was the IFN- α 2WT molecule for inhibiting HCV RNA synthesis in BM4-5 cells. Interestingly, long-term treatment with GEA007.1 was able to cure BM4-5 cells from the

* Corresponding author. Mailing address: INSERM, U271, 151 cours Albert Thomas, 69424, Lyon Cedex 03, France. Phone: 33-472 681 970. Fax: 33-472 681 971. E-mail: zoulim@lyon.inserm.fr.

[▽] Published ahead of print on 25 September 2006.

HCV replicon, which was in contrast to the results obtained with the standard IFN- α 2WT molecule tested under the same conditions. Moreover, based on mechanistic studies, we propose that the increased efficacy of the novel IFN- α 17 variant GEA007.1 against HCV replication is likely to be due to a more potent activation of the JAK-STAT transduction pathway in BM4-5 cells, following the interaction of GEA007.1 with type I IFN receptor.

MATERIALS AND METHODS

Identification and production of IFN- α variants. Original genetic variants of 14 different human IFN- α protein subtypes were provided by GenOdyssey. The discovery of natural cytokine mutants with improved therapeutic utilities was performed using the following process: a genomic DNA library was constituted with genomic DNA from 239 different individuals, representing altogether 85% of the human ethnic diversity of the worldwide population, and screened for nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in the coding sequences of the 14 different human IFN- α gene subtypes. The identification and selection of IFN- α protein mutants with functionally relevant amino acid mutations was then carried out using bioinformatics tools, including sequence/structure analysis and molecular modeling. IFN- α variants, hereafter named GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1, and GEA013.1, derived from such procedures, are natural mutants of human IFN- α 17, IFN- α 21, IFN- α 5, and IFN- α 7, respectively (Swiss-Prot primary accession numbers P01571, P01568, P01569, and P01567, respectively). All carry a unique amino acid mutation (G45R for GEA007.1, D95N for GEA013.1, C122S for GEA011.1, and K179E for GEA009.2), with changes in three-dimensional structure and electrostatic isopotential at the receptor binding surface, based on molecular modeling. The recombinant human IFN- α variants used in this study were produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, with a yield of approximately 10 to 20 mg/liter, following the protocols and recommendations provided by Research Corporation Technologies, Inc. IFN ν proteins were secreted into the culture medium and purified using Cibacron and ion exchange chromatography to obtain pure preparations of recombinant human IFN ν in a phosphate-buffered saline (PBS) solution. The purity of each preparation was greater than 95%, and endotoxin content, determined by *Limulus* amoebocyte lysate, was less than 5 IU/ μ g. IFN- α 2b, hereafter named IFN- α 2WT, was synthesized and purified using the same process in order to be an relevant control. In our experiments, 1 mg of IFN- α produced in yeast was equivalent to 3×10^8 IU (i.e., 1 IU is equivalent to 3.33 pg). Stock solutions were stored at -80°C . Dilutions of these stock solutions were carried out in PBS extratemporally. Prior to activity testing of the different IFN preparations against HCV in the replicon model, the preparations were tested for their specific activities and standardized in vitro using a gene reporter assay as described previously elsewhere (17). It was shown that the inhibitory activities of IFN- α 2WT produced in *Pichia pastoris* and manufactured IFN- α 2b (intron A; Schering Plough Corporation) produced in *Escherichia coli* are similar, indicating that the yeast *Pichia pastoris* production system does not affect the activity of IFN- α .

Cell culture. BM4-5 cells (from a Huh7 cell line harboring an HCV genotype 1b subgenomic replicon), kindly provided by C. Seeger (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pa.), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium medium (Invitrogen) complemented with 10% fetal calf serum (Perbio), antibiotics, and 500 μ g/ml of Geneticin (G418 sulfate; Invitrogen) as previously described (10).

Protocols of administration of IFN. Sixteen hours before starting treatments, BM4-5 cells were seeded in six-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/well. IFN ν (GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1, and GEA013.1) and IFN- α 2WT were administered to cells in complete medium in the absence of Geneticin. For short-term treatments, the administration of each drug (at concentrations ranging from 0 to 3,333 pg/ml) was renewed every day for three consecutive days. For long-term treatments, IFN- α 2WT or GEA007.1 was administered every day at 333 pg/ml for 21 days. In order to maintain cells in the proliferation/division stage, cells were trypsinized and diluted four times every 4 days. A total of five passages were performed during treatment. At the end of this period of treatment, the administration of IFN- α 2WT and GEA007.1 was interrupted and cells were kept for five further passages in medium either containing or not containing Geneticin to monitor a potential rebound of HCV subgenomic RNA replication.

Analysis of IFN toxicity. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 12,500 cells/well. They were treated by IFNs with the same concentrations and conditions as those used for short-term inhibitory assays. Cell viability was measured by both neutral red and MTS (CellTiter 96 Aqueous One Solution cell

proliferation assay; Promega) tests. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the concentration of interferon leading to a 50% reduction in the absorbance value compared to that of nontreated cells.

Analysis of HCV subgenomic RNA synthesis. Total RNA was extracted with the Extract All reagent according to manufacturer's instructions (Eurobio). Northern blot analysis was then performed using the NorthernMax-Gly kit according to manufacturer's instructions (Ambion). Briefly, 5 μ g of total RNA were denatured in glyoxal buffer at 50°C for 30 min, separated on 1.1% agarose gel, and transferred overnight by capillarity onto a charged nylon membrane (HybondN+; Amersham). Hybridization was carried out with three different [32 P]CTP-labeled riboprobes obtained by in vitro transcription (riboprobe in vitro transcription system; Promega). Two probes complementary to the NS5A region were used to detect either the negative or the positive HCV subgenomic RNA strands. A third probe was complementary to the β -actin mRNA and obtained by in vitro transcription using the plasmid pTRI-beta-actin-human (Ambion). First, the blot was hybridized for 16 h at 68°C with the two riboprobes directed against the negative strand of HCV subgenomic RNA and β -actin mRNA. After hybridization, the membrane was washed twice in stringent conditions and then exposed sequentially to X-ray film and a phosphor screen for quantification. The β -actin mRNA was used as an internal loading control to standardize the amount of HCV subgenomic RNA detected. The same membrane was subsequently hybridized with the negative-sense riboprobe to visualize and quantify the level of positive HCV subgenomic RNA strand, using the same procedure.

Analysis of the signal transduction pathway induced by IFN- α treatment in BM4-5 cells. To evaluate the activation of intracellular signaling pathways by IFN- α 2WT and IFN ν , BM4-5 cells (75×10^3 cells/well in 24 wells plate) were transfected with an interferon-stimulating response element (ISRE)-luciferase plasmid (Stratagene) by using the TransIT-TKO reagent (Mirus) following the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours after transfection, duplicate cultures in 24-well plates were either left untreated or treated for 24 h with a range of IFN- α 2WT and IFN ν of 0.3, 3, 33, 333, and 3,333 pg/ml. Cells were then washed with cold PBS and lysed by passive lysis buffer (Promega), and the luciferase activity was measured as recommended by the manufacturer (Promega). The luciferase activity induced by IFN- α 2WT for each concentration was taken as 100%, and other luciferase activities were normalized accordingly.

Western blot analysis. IFN- α 2WT or GEA007.1 was administered to BM4-5 cells at a concentration of 3,333 pg/ml or 33 pg/ml for 30 min and 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h. Administration was renewed every 24 h. At the indicated time, cells were washed twice with cold PBS and then lysed using a buffer (0.2% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 0.1% glycerol, 10 mM dithiothreitol) containing serine/threonine phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 200 μ M orthovanadate) and protease inhibitor (Complete protease inhibitor; Roche). Proteins of cell lysates were denatured at 100°C in Laemmli buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 1.25% 2-mercaptoethanol), separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Nonspecific binding sites were blocked for 2 h at room temperature with 5% milk, 0.1% Tween 20 in PBS. The membrane was then incubated overnight at 4°C with monoclonal antibodies raised against PKR (Santa Cruz Biotechnology), p48 (Becton Dickinson), or β -actin (Sigma). Membranes were then washed three times and incubated at room temperature for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (Immunotech) at 1/10,000. Bound antibodies were detected by using ECL technology (ECL+ for p48 and ECL for PKR and β -actin) as specified by the manufacturer (Amersham Biosciences).

Analysis of IFN- α -specific gene expression using GEArray Q series array. BM4-5 cells were incubated in six-well plates at 80% confluence. The cells either were left untreated or were incubated with IFN- α 2WT or GEA007.1 at the same concentration of 33 pg/ml. After 8 h of incubation, total RNA was extracted with the Extract All reagent (Eurobio) and stored at -80°C . For one set of experiments, six arrays (GEArray Q series Human Interferon α,β Response gene array; SuperArray Bioscience Corporation) were used following the manufacturer's recommendation. For each array, 96 gene-specific cDNA fragments are printed on a nylon membrane of 3.8 by 4.8 cm. The list of the genes is accessible from the SuperArray web site (document HS-054). A total of 3 μ g of each RNA sample was used as a template to generate cDNA by reverse transcription. cDNA was then amplified and labeled with biotin-16-dUTP (Roche) by a linear polymerase reaction (AmpoLabeling-LPR kit). After a step of prehybridization, the membranes were hybridized overnight, with the different probes corresponding to the different treatments. The signal was revealed by chemiluminescent reaction using alkaline phosphatase-conjugated streptavidin and detected by a scanner camera (Bio-Rad). All results were obtained from the analysis of nonsaturated images

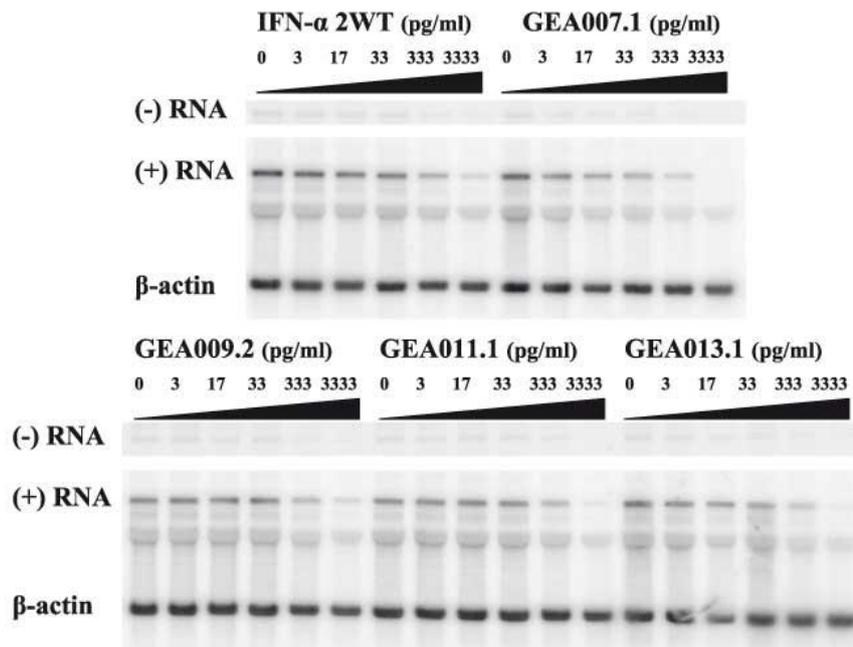


FIG. 1. GEA007.1 has improved inhibitory properties compared to IFN- α 2WT and other IFN- α variants in the replicon system. BM4-5 cells were treated during 3 days by IFN- α 2WT, GEA007.1., GEA009.2, GEA011.1, or GEA013.1 at 0, 3, 17, 33, 333, and 3,333 pg/ml. Total RNA was isolated from the cells and analyzed by Northern blotting for negative and positive HCV subgenomic RNA. β -Actin serves as an internal control for loading of cellular RNA.

after 2 min of exposure. Spot quantification was performed with Quantify-One software (Bio-Rad). The mean intensity of blank spots served as negative controls and was subtracted from other values. The mean intensity of β -actin gene served as a positive control and was used to normalize the intensities of the spots to allow relative comparisons between the different arrays. To determine which genes were up-regulated, the intensities of spots resulting from hybridization with cDNA obtained from total RNA extracted from untreated cells were used to establish the basal expression level. The up-regulation of genes under interferon treatment was reported as a positive severalfold increase compared to those of untreated control samples.

RESULTS

Identification of novel IFN- α variants with improved inhibitory properties. Based on the hypothesis that, in human populations, the natural evolution of the human genome has likely created a series of unpredictable and functionally relevant genetic variants with various structural and biological properties, nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms were searched in the genomes of 239 individuals representing altogether 85% of the current ethnic diversity of the human population to identify interesting novel alleles of IFN- α genes coding for IFN- α proteins with superior or novel therapeutic properties compared to those of standard IFN- α 2a or IFN- α 2b. Following this approach, several IFN ν , 17, 21, 5, and 7, referred to as GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1, and GEA013.1, respectively, were selected for their significantly improved (GEA007.1 and GEA013.1) or decreased (GEA009.2 and GEA011.1) inhibitory properties compared to those of standard IFN- α 2WT, based on preliminary data obtained with both an in vitro model of vesicular stomatitis virus-infected WISH cells and an in vivo model of encephalomyocarditis virus-infected mice (data not shown).

Anti-HCV effect of novel IFN- α variants. To evaluate and quantify the inhibitory effect of these novel IFN ν , BM4-5 cells were treated for 3 days with increasing concentrations of GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1, and GEA013.1 as well as with IFN- α 2WT used as a reference. Total RNA was extracted and subjected to Northern blot analysis with three different riboprobes designed to detect both negative and positive HCV subgenomic RNA strands and β -actin mRNA (Fig. 1). A dose-dependent reduction in the amount of HCV subgenomic RNA was observed with all IFN ν tested, and the greatest effect was obtained with GEA007.1. Three independent experiments were performed to obtain statistically relevant data. The quantification of the relative intensity of HCV subgenomic RNA and control β -actin signals after exposure to phosphor screens allowed the calculation of the 50% effective concentration (EC₅₀), which was defined as the concentration required to induce a reduction of 50% of the amount of HCV subgenomic

TABLE 1. Inhibitory features and toxicity of various interferons^a

Interferon	EC ₅₀ (pg/ml)	<i>P</i> ^b	EC ₉₀ (pg/ml)	<i>P</i> ^b	CC ₅₀ (pg/ml)
IFN- α 2WT	154.2 \pm 8.8		3,080 \pm 406		>3,333
GEA007.1	22.7 \pm 9.4	<0.05	471 \pm 276	<0.05	>3,333
GEA009.2	483.3 \pm 86.6	<0.05	>3,333	>0.05	>3,333
GEA011.1	187.9 \pm 57.5	>0.05	>3,333	>0.05	>3,333
GEA013.1	95.6 \pm 86.6	<0.05	2,156 \pm 300	>0.05	>3,333

^a Indicated EC₅₀, EC₉₀, and CC₅₀ \pm standard deviation values are the means of at least three independent experiments.

^b The Mann-Whitney test was used to determine whether the activities of GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1, and GEA013.1 of inhibiting HCV subgenomic replicon were significantly different from that with IFN- α 2WT treatment.

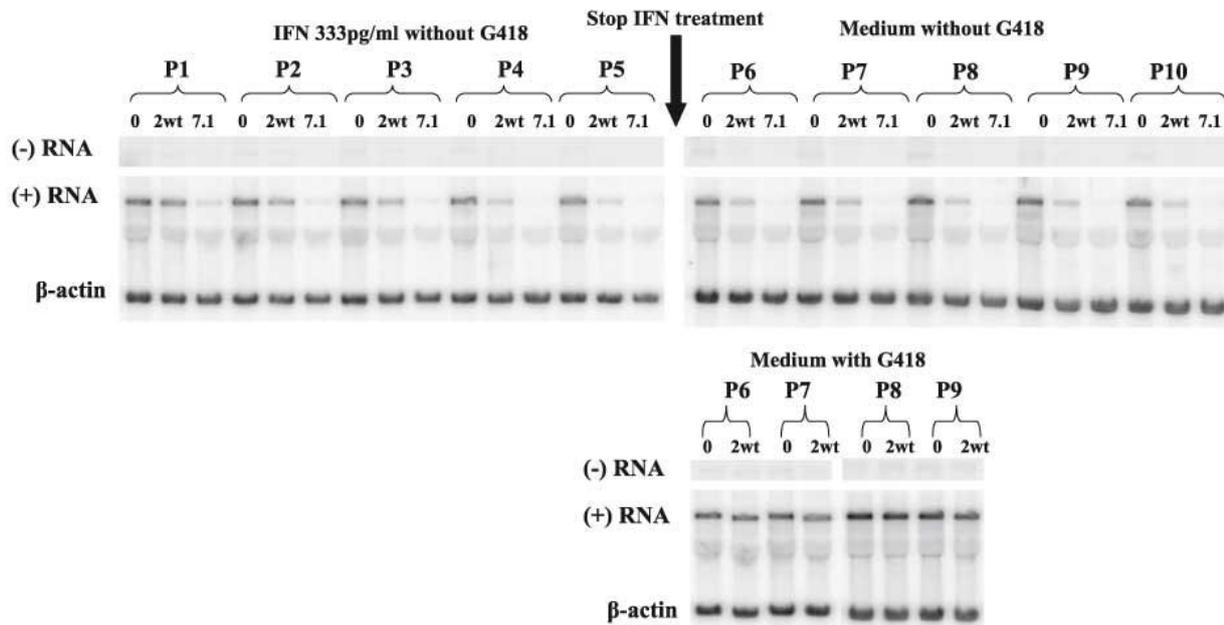


FIG. 2. GEA007.1 is able to clear HCV from BM4-5 cells after prolonged administration. BM4-5 cells were left untreated or treated every day with either IFN- α 2WT or GEA007.1 at 333 pg/ml in the absence of Geneticin (upper panel left). At confluence, cells were passaged by a 1:4 dilution. After five passages, the treatment was stopped and cells were further passaged by a 1:4 dilution in medium free of Geneticin (upper panel right) or containing Geneticin (lower panel right). In the latter case, no result was presented for GEA007.1, as cells died in the presence of Geneticin (see the text for details). At each passage, total RNA was isolated from cells, separated on an agarose gel, and analyzed by Northern blotting for the detection of negative and positive RNAs. β -Actin served as an internal loading control. P, cell passage; 0, no IFN treatment; 2wt, treatment with IFN- α 2WT; 7.1, treatment with GEA007.1.

RNA detected by Northern blotting after normalization for each IFN tested (Table 1). Two IFNv, GEA007.1 and to a lesser extent GEA013.1, had better EC₅₀s than did IFN- α 2WT, suggesting higher efficacies of these molecules compared to that of the control. The better inhibitory activity of GEA007.1 ($\times 7$) and GEA013.1 ($\times 1.5$) over that of IFN- α 2WT remained significant when the EC₉₀s of the drugs were concerned (Table 1). This inhibitory activity was not due to toxicity, as no IFNs tested showed any cytotoxic effect on the BM4-5 cells, with the CC₅₀ (i.e., 50% cytotoxic concentration) always superior to 3,333 pg/ml, the highest dose used in our experiments (Table 1).

Long-term administration of GEA007.1 cures cells from the HCV genotype 1b replicon subgenome. Having established that GEA007.1 had the best inhibitory activity compared to that of IFN- α 2WT, with a very good EC₉₀, we asked whether a prolonged administration of this IFNv could induce a better-sustained inhibitory effect than that of IFN- α 2WT and lead to the rapid eradication of HCV replication in cells. BM4-5 cells were treated during 20 days through five passages with either IFN- α 2WT or GEA007.1 at a single concentration of 333 pg/ml in medium without Geneticin as described in Materials and Methods. The results of a Northern blot analysis presented in Fig. 2 show that HCV subgenomic RNA synthesis was inhibited more intensively by GEA007.1 than by IFN- α 2WT, thus confirming the better inhibitory activity of GEA007.1. Moreover, after 20 days of treatment and five passages, HCV subgenomic RNAs (both strands) were no longer detectable in cells treated with 333 pg/ml of GEA007.1, whereas the positive-strand HCV subgenomic RNA was still detectable in stan-

dard IFN- α 2WT-treated cells. To monitor the potential rebound of HCV replication after the cessation of treatment, cells were kept untreated for at least four additional passages in either the absence or the presence of Geneticin. The presence of Geneticin was meant to select back more efficiently HCV replication from the very low level of residual replication after 20 days of treatment with IFN. In the absence of Geneticin, HCV subgenomic RNA remained undetectable after five passages posttreatment in GEA007.1-treated cells, whereas a small amount of positive-strand HCV subgenomic RNA was maintained in IFN- α 2WT-treated cells (Fig. 2). When cells were cultured in a medium with Geneticin after treatment cessation, the cells that had been treated with IFN- α 2WT could survive, but it took five more days for these cells to reach confluence relative to untreated cells. Interestingly, cells that had been treated with GEA007.1 were no longer able to survive in the presence of Geneticin, indicating that GEA007.1 was able to cure the cells from HCV subgenomic RNA (Fig. 2). In our experimental conditions, GEA007.1, but not IFN- α 2WT, was able to eliminate HCV replication from BM4-5 cells, thus once again indicating the better efficacy of this variant molecule over that of the wild type.

Stronger and faster expression of proteins of type I IFN signal transduction pathway in BM4-5 cells is obtained with GEA007.1 compared to that with IFN- α 2WT. Having established that GEA007.1 had better anti-HCV properties than did IFN- α 2WT in the replicon system, we sought to determine whether the higher activity of GEA007.1 was associated with a better activation of key cell signaling proteins involved in type I IFN transduction pathways. To this end, two sets of experi-

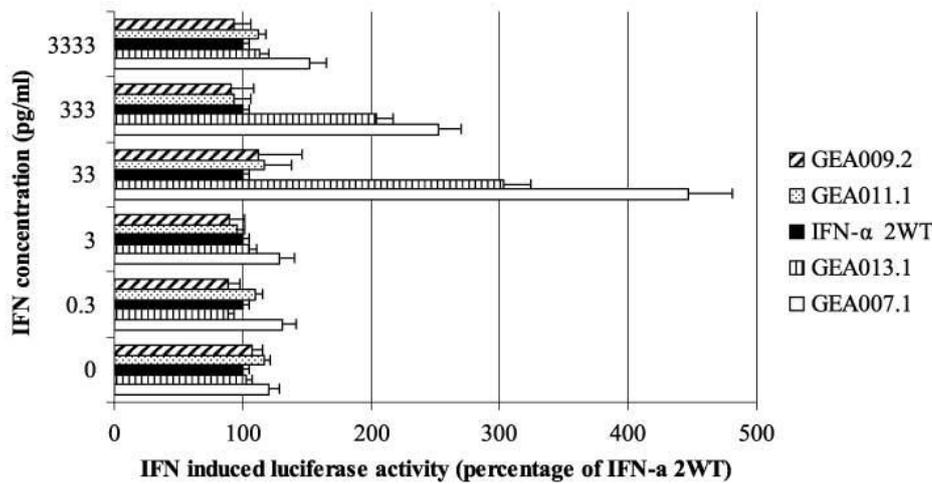


FIG. 3. GEA007.1 is a better inducer of the IFN signaling pathways than is IFN- α 2WT. BM4.5 cells were transfected with an ISRE luciferase construct. Twenty-four hours after transfection, the cells were incubated without or with IFN- α 2WT and GEA007.1 for 24 h. The cells were then harvested and assayed for luciferase activity. The luciferase activity induced by IFN- α 2WT for each concentration was taken as 100%, and other luciferase activities were normalized accordingly. Mean values \pm standard deviations (error bars) of three independent experiments are shown. The absolute luciferase values obtained with increasing concentration of IFN- α 2WT of 0, 0.3, 3, 33, 333, and 3,333 pg/ml were 205, 234, 226, 217, 798, and 2,004, respectively.

ments were performed. First, BM4-5 cells were transfected with a reporter plasmid containing an interferon-stimulating response element upstream driving the expression of the firefly luciferase. Twenty-four hours after transfection, culture either was left untreated or was treated with a range of IFN- α 2WT and IFN ν of 0.3, 3, 33, 333, and 3,333 pg/ml. Luciferase activity was measured 24 h later, and results obtained with IFN ν for each concentration were normalized to IFN- α 2WT-induced activity (Fig. 3). The results showed an increased activation of the IFN-stimulating pathway with GEA007.1 compared to that of the others IFNs with the following order GEA007.1 > GEA013.1 > IFN- α 2WT = GEA011.1 > GEA009.2. By comparison with that of IFN- α 2WT, increased activations of three- and twofold of the IFN signaling pathways was observed with GEA007.1 at the concentrations of 33 and 333 pg/ml, respectively. At a higher concentration, i.e., 3,333 pg/ml, the difference of activation was not significant, most likely because of the saturation of the IFN receptor. Further experiments were therefore performed with a low IFN concentration of 33 pg/ml (a value equivalent to 10 IU) to clearly see differences between IFN- α 2WT and GEA007.1. Western blot analyses were performed to further characterize the expression of proteins involved in the IFN signaling pathway. BM4-5 cells were treated with either GEA007.1 or IFN- α 2WT at 33 pg/ml for 30 min and 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h, and proteins were extracted and subjected to Western blot analysis using antibodies directed against p48 (interferon regulatory factor 9) and PKR, two important proteins of the type I IFN transduction pathways (25). With these conditions, GEA007.1 triggered faster and stronger expression of PKR and recruitment of p48 proteins in BM4-5 cells than did IFN- α 2WT. The difference in activation of IFN-inducible proteins was more marked for p48. In our experimental conditions, the low dose of IFN- α 2WT did not allow us to visualize a significant increase of the expression of p48 and PKR proteins (Fig. 4).

IFN-responsive gene expression is stronger and broader after treatment with GEA007.1 than after treatment with IFN- α 2WT. To broaden results obtained by Western blotting analysis and gain a global view of the differences in transduction pathway activation activities elicited by GEA007.1 and IFN- α 2WT in BM4-5 cells, the expression of IFN- α -stimulated genes (ISGs) was analyzed using cDNA expression arrays. BM4-5 cells were left untreated or treated with either 33 pg/ml of GEA007.1 or IFN- α 2WT for 8 h. RNA was then extracted and used for RT-PCR. Labeled cDNA was used for the hy-

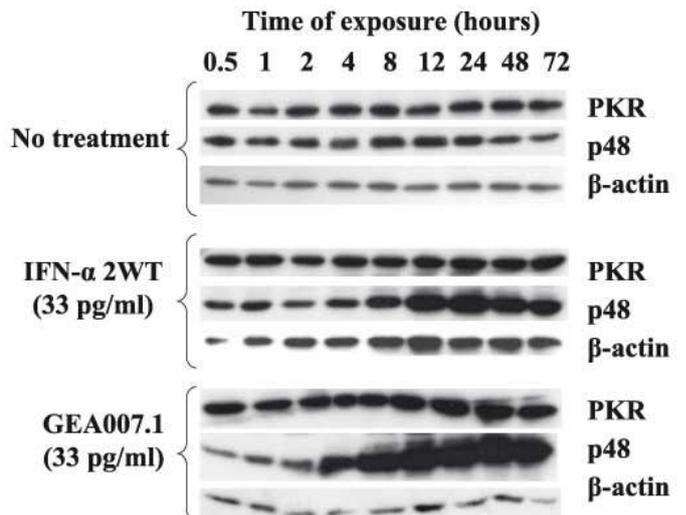


FIG. 4. Effect of GEA007.1 on PKR and p48 (interferon regulatory factor 9) protein expression. BM4-5 cells were cultured in the absence or presence of 33 pg/ml of IFN- α 2WT or GEA007.1. At different time points following the administration of IFNs, total cellular proteins were extracted and subjected to Western blot analysis using anti-PKR or anti-p48 antibodies. As a loading control, Western blot analysis was performed with anti-actin antibodies.

TABLE 2. Relative gene induction in BM4-5 cells after 8 h treatment with IFN- α 2WT or GEA007.1^a

Gene name	Increase (<i>n</i> -fold) with indicated treatment ^b	
	IFN- α 2WT	GEA007.1
MX1	17.83	25.92
ISG-56	2.055	4.455
ISG-15	1.7	4.125
ISG-60	1.27	3.985
ADAR	1.38	2.91
KIAA1268	1.19	2.35
IFI6-16	0.795	2.13
STAT1	1.38	2.08
MAPKK1/MEK1	0.65	1.72
PKR	0.89	1.535
P48/IRF-9	0.82	1.365

^a Human Interferon α, β Response gene arrays (SuperArray) were performed with a concentration of 33 pg/ml of IFN. Indicated values are the means of two independent experiments.

^b Results are relative to that with no treatment.

bridization of arrays as described in Materials and Methods. Relative intensities for the different genes and conditions of treatment were calculated, and results from significant up-regulation in BM4-5 cells induced by the administration of either IFN are reported in Table 2. An increase in gene expression of more than twofold was considered significant. Two IFN-responsive genes, MX1 and ISG56 (25), were found significantly up-regulated following IFN- α 2WT treatment, while a stronger and a broader up-regulation of genes (MX1, ISG56, ISG15, ISG60, ADAR, KIAA1268, and STAT1) was found associated with GEA007.1 inhibitory activity in BM4-5 cells. In this experiment, the dose of IFN- α 2WT chosen to point out differences with GEA007.1 was not high enough to trigger a strong activation of gene expression, in particular for PKR and p48, at least in our experimental conditions. This result is in good correlation with the lack of increase of the protein amount observed by Western blotting (Fig. 4). Collectively, these results confirm better activation of type I IFN signal transduction in these cells with GEA007.1 than with IFN- α 2WT at the same concentration and time of exposure. This better ability to induce a stronger, faster, and broader cell signaling response was therefore associated with a superior inhibitory property of GEA007.1 over that of IFN- α 2WT observed in cells harboring the HCV genotype 1b replicon.

DISCUSSION

While we wait for the development and clinical use of new anti-HCV molecules, alpha interferon remains a major component of the anti-HCV therapy. Its use may also remain mandatory in combination with novel HCV inhibitors to prevent resistance to the latter drugs (8). However, the currently used IFN- α 2a and IFN- α 2b are not efficient in all cases. Non-responding and relapsing patients are observed with current pegylated IFN- α /ribavirin combination therapies. Many factors may explain this resistance of the virus to short- or long-term viral clearance activity of IFN- α 2, including host genetic and virological factors. For instance, it is well known that patients infected with HCV genotype 1 have significantly lower re-

sponse rates (5, 6) and that genetic host factors may influence the response rate to interferon-based therapies (2, 16).

The main objective of this work was to determine whether better anti-HCV genotype 1 IFN molecules than the clinically used alpha interferon 2a and 2b could be identified among the novel IFN- α variants GEA007.1 and GEA013.1 with improved inhibitory properties against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus (data not shown). For this study, IFN- α 2b (IFN- α 2WT) served as the standard IFN- α and additional IFN- α variants with low-inhibitory properties, GEA009.2 and GEA011.1, were included as negative controls. GEA007.1, GEA013.1, GEA009.2, and GEA011.1 were all identified with an original approach using the natural genetic variation of cytokine genes. Basically, the genomes of 239 individuals, representing altogether 85% of the human ethnic diversity, were searched for new and natural functionally relevant genetic mutants of the different human IFN- α subtypes, and variants with potential superior activities compared to that of IFN- α 2 were selected. BM4-5 cells from a Huh7 cell line harboring an HCV genotype 1b subgenomic replicon were used to test the inhibitory properties of IFN- α variants. Interestingly, among the four interferon variants tested in this study, GEA007.1 and to a lesser extent GEA013.1 were found to be significantly more potent than IFN- α 2WT for inhibiting the replication of an HCV genotype 1b subgenomic replicon in BM4-5 cells. GEA007.1 was the best molecule tested with an EC₅₀ of 22.7 pg/ml, which is seven times lower than the EC₅₀ obtained from standard IFN- α 2WT (i.e., 154.2 pg/ml) in the same conditions (Table 1). Moreover, we found that GEA007.1, administered at 333 pg/ml every day for 20 days, was able to clear the HCV subgenomic replicon from BM4-5 cells, while HCV subgenomic RNA was still detected in cells treated with standard IFN- α 2WT under the same conditions (Fig. 2). This result demonstrates the superiority of GEA007.1 over IFN- α 2b in an HCV genotype 1b subgenomic replicon system. However, the results obtained from the HCV subgenomic replicon system may not translate into antiviral activity *in vivo*. Therefore, our results warrant further evaluation of GEA007.1 *in vitro*, using systems allowing a complete multiplication of HCV (19, 27, 28), and *in vivo*, in the frame of clinical trials.

The biological activity of IFN- α is related to its capacity to induce type I IFN signal transduction pathways after interaction with its cellular receptor. Different mechanisms have been proposed to explain the inhibitory effects of IFN- α against HCV replication, including noncytopathic and cytopathic processes (12). It was shown that the *in vitro* noncytopathic inhibition of HCV RNA replication by IFN- α in Huh7 cells is dependent on a functional JAK-STAT pathway and proteasome. However, double-stranded RNA-dependent antiviral pathways, such as the PKR and RNase L pathways, were shown not to be involved in IFN-induced inhibition of HCV replication in Huh7 cells (12). The IFN- α -induced antiviral program (i) could affect HCV internal ribosome entry site-directed translation and therefore cause a reduction in viral protein and (ii) could in turn inhibit viral RNA amplification as a result of a tight linkage between translation, assembly of replication complexes, and viral RNA synthesis (11). Interestingly, using an ISRE reporter assay, we showed an increased activation of the IFN-stimulating pathway by GEA007.1 rela-

tive to IFN- α 2WT, which was associated with a better inhibitory activity on HCV subgenomic RNA synthesis. Then we analyzed key cell signaling proteins involved in the type I IFN transduction pathway after BM4-5 cells were exposed to GEA007.1 or IFN- α 2WT. Western blot analyses were performed to monitor the level of expression of some key proteins like p48 or PKR, and cDNA expression array experiments were performed to monitor the expression of IFN- α -responsive genes. GEA007.1 induced a stronger expression of p48 than did IFN- α 2WT. This result suggests that p48 may be recruited more efficiently by the STAT1^P and STAT2^P heterodimer complex to form the ISGF3 complex (25) after treatment with GEA007.1 than after treatment with IFN- α 2WT. Our results are in accordance with previous works showing that type I IFN signaling pathways are qualitatively functional in Huh7 and BM4-5 cell lines, as persistent HCV replication does not modify gene expression patterns after IFN- α treatment (13, 21). In addition, in our experimental conditions, IFN- α -responsive genes activated in Huh7 cells harboring HCV subgenomic replicon by both GEA007.1 and IFN- α 2WT did not differ from those described and reported in other studies (13, 21). Lastly, a stronger and broader expression of IFN- α -responsive genes was seen in BM4-5 cells treated with GEA007.1 than those treated with IFN- α 2WT. Among the most activated genes found were Mx1, ISG56, ISG15, ISG60, ADAR, KIAA1268, and STAT1. Mx1 (also named MxA) was the most induced gene in our system. Mx1 was also found previously as an important IFN- α -inducible gene in IFN- α -treated replicon cell lines (13). A stronger expression of Mx1 was observed in cells treated with GEA007.1 which in turn could have contributed to the better inhibitory effect of GEA007.1 compared to IFN- α 2WT. In view of the results obtained by others, showing the absence of inhibition of HCV RNA replication by Mx1 (6), it might be hypothesized that the activation of the different genes described can be only a reflection of the activation of the Jak-Stat pathway, without predicting a direct inhibitory role for a specific gene. Moreover, it is not possible at this stage to rule out the possibility that GEA007.1 may also induce unknown IFN-inducible genes responsible for an enhanced inhibitory activity. The ability of GEA007.1 to trigger a strong antiviral response in HCV-infected BM4-5 cells is most likely due to either a better interaction of this IFN to the cellular receptor or a better activity of the complex IFN receptor in transmitting the antiviral signal. The affinity of IFN to its receptor is a major issue in terms of efficacy. For instance, it was shown that different pegylation patterns of IFN could lead to different efficacy of binding to its cellular receptor and activation of the corresponding cell signaling pathway (9). One may hypothesize that GEA007.1 has a better affinity to the type I IFN receptor (IFNAR) and/or that the complex formed between GEA007.1 and IFNAR has a better capacity of signal transduction than the complex formed between IFN- α 2 and IFNAR. Work is in progress to confirm this hypothesis. The difference in binding properties of GEA007.1 and standard IFN- α 2WT could be due to the differences observed in the amino acid sequence of GEA007.1. In particular, GEA007.1 possesses a unique G45R mutation with significant change in three-dimensional structure and electrostatic isopotential at the receptor binding site, relative to IFN- α 17WT protein or IFN- α 2WT protein.

In conclusion, this study shows that the IFN- α variant

GEA007.1 exhibits a more potent and sustained inhibitory activity on HCV genotype 1b subgenomic replicon replication than does standard IFN- α 2b. This enhanced inhibitory activity is associated with a more efficient induction of the JAK/STAT cell signaling pathway. These results warrant further evaluation to determine whether this enhanced activity in the HCV subgenomic replicon system could translate into a clinical benefit, especially in naïve HCV genotype 1b-infected patients who do not respond well to the currently available IFN- α 2/ribavirin combination therapies as well as in non-responder patients who represent a growing population of difficult-to-treat patients. Clinical trials are required to determine the potential of GEA007.1 to fulfill this unmet clinical need. It will be also interesting to see the inhibitory effect of GEA007.1 on other HCV genotypes both in vitro and in vivo. Furthermore, an IFN- α variant with an enhanced anti-HCV genotype 1 activity may be of utmost clinical relevance in the perspective of the new generation of treatment regimens, combining IFNs with specific small-molecule HCV inhibitors in current development (4).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant of the European Community and is part of the activities of the VIRGIL European Network of Excellence (contract LSHM-CT-2004-503359).

REFERENCES

- Bartenschlager, R., and V. Lohmann. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antivir. Res.* **52**:1–17.
- Chen, L., I. Borozan, J. Feld, J. Sun, L. L. Tannis, C. Coltescu, J. Heathcote, A. M. Edwards, and I. D. McGilvray. 2005. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology* **128**:1437–1444.
- Davis, G. L., J. E. Albright, S. F. Cook, and D. M. Rosenberg. 2003. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl.* **9**:331–338.
- De Francesco, R., and G. Migliaccio. 2005. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* **436**:953–960.
- Feld, J. J., and J. H. Hoofnagle. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **436**:967–972.
- Frese, M., T. Pietschmann, D. Moradpour, O. Haller, and R. Bartenschlager. 2001. Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J. Gen. Virol.* **82**:723–733.
- Frese, M., V. Schwarzle, K. Barth, N. Krieger, V. Lohmann, S. Mihm, O. Haller, and R. Bartenschlager. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* **35**:694–703.
- Fried, M. W., M. L. Shiffman, K. R. Reddy, C. Smith, G. Marinos, F. L. Goncalves, Jr., D. Haussinger, M. Diago, G. Carosi, D. Dhumeaux, A. Craxi, A. Lin, J. Hoffman, and J. Yu. 2002. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**:975–982.
- Grace, M. J., S. Lee, S. Bradshaw, J. Chapman, J. Spond, S. Cox, M. Delorenzo, D. Brassard, D. Wylie, S. Cannon-Carlson, C. Cullen, S. Indelicato, M. Voloch, and R. Bordens. 2005. Site of pegylation and polyethylene glycol molecule size attenuate interferon-alpha antiviral and antiproliferative activities through the JAK/STAT signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**:6327–6336.
- Guo, J. T., V. V. Bichko, and C. Seeger. 2001. Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J. Virol.* **75**:8516–8523.
- Guo, J. T., J. A. Sohn, Q. Zhu, and C. Seeger. 2004. Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology* **325**:71–81.
- Guo, J. T., Q. Zhu, and C. Seeger. 2003. Cytopathic and noncytopathic interferon responses in cells expressing hepatitis C virus subgenomic replicons. *J. Virol.* **77**:10769–10779.
- Hayashi, J., R. Stoyanova, and C. Seeger. 2005. The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology* **335**:264–275.
- Iqbal Ahmed, C. M., and H. M. Johnson. 2003. Interferon gene therapy for the treatment of cancer and viral infections. *Drugs Today* **39**:763–766.
- Ishida, H., K. Ohkawa, A. Hosui, N. Hiramatsu, T. Kanto, K. Ueda, T. Takehara, and N. Hayashi. 2004. Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**:722–727.

16. Kinzie, J. L., P. H. Naylor, M. G. Nathani, R. R. Peleman, M. N. Ehrinpreis, M. Lybik, J. R. Turner, J. J. Janisse, M. Massanari, and M. G. Mutchnick. 2001. African Americans with genotype 1 treated with interferon for chronic hepatitis C have a lower end of treatment response than Caucasians. *J. Viral Hepat.* **8**:264–269.
17. Lallemand, C., P. Lebon, P. Rizza, B. Blanchard, and M. G. Tovey. 1996. Constitutive expression of specific interferon isotypes in peripheral blood leukocytes from normal individuals and in promonocytic U937 cells. *J. Leukoc. Biol.* **60**:137–146.
18. Lanford, R. E., B. Guerra, H. Lee, D. R. Averett, B. Pfeiffer, D. Chavez, L. Notvall, and C. Bigger. 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J. Virol.* **77**:1092–1104.
19. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**:623–626.
20. Manns, M. P., J. G. McHutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury, M. Ling, and J. K. Albrecht. 2001. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* **358**:958–965.
21. Pai, M., R. Prabhu, A. Panebra, S. Nangle, S. Haque, F. Bastian, R. Garry, K. Agrawal, S. Goodbourn, and S. Dash. 2005. Activation of interferon-stimulated response element in huh-7 cells replicating hepatitis C virus subgenomic RNA. *Intervirology* **48**:301–311.
22. Parmar, S., and L. C. Platanias. 2003. Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr. Opin. Oncol.* **15**:431–439.
23. Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:375–386.
24. Poynard, T., M. F. Yuen, V. Ratziu, and C. L. Lai. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* **362**:2095–2100.
25. Samuel, C. E. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:778–809.
26. Seeff, L. B. 2002. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* **36**:S35–46.
27. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**:791–796.
28. Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, and F. V. Chisari. 2005. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:9294–9299.

B - INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'interféron alpha (IFN- α) est à la base du traitement de l'hépatite C en combinaison avec la ribavirine. Utilisé d'abord en monothérapie (Hoofnagle, 1986), puis en combinaison avec la ribavirine (Poynard *et al.*, 1998) et enfin sous une forme pégylée, toujours en association avec la ribavirine (Fried *et al.*, 2002; Manns, 2001), c'est une molécule efficace mais qui n'est pas dénuée d'effets secondaires ; les principaux étant un syndrome pseudo-grippal et une dépression nerveuse. **La recherche de nouveaux IFN, plus efficaces et permettant de diminuer ces effets par diminution des dosages est nécessaire.**

MODELE EXPERIMENTAL

Avant le développement récent du système de réplication complet du VHC (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005), les réplicons du VHC étaient le modèle le plus approprié pour étudier la réplication du VHC et l'effet de composés antiviraux potentiellement capables d'inhiber cette réplication (Blight *et al.*, 2000; Lohmann *et al.*, 1999). Avant d'amorcer ce travail, nous avons étudié l'activité antivirale des IFN- α , β et γ en utilisant ce modèle et montré, comme d'autres équipes, que les IFN- α , β et γ sont capables d'inhiber la réplication de l'ARN du VHC dans le système des réplicons (Cheney *et al.*, 2002; Frese *et al.*, 2001; Frese *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2001; Lanford *et al.*, 2003). En outre, les voies de transduction du signal induites par la fixation des IFN- α sur leur récepteur sont fonctionnelles dans les cellules Huh-7, bien que certaines voies normalement activées par les ARN double-brin soient défectives dans ces cellules (Keskinen *et al.*, 1999; Lanford *et al.*, 2003; Melen *et al.*, 2000).

INTERFERONS-ALPHA VARIANTS

Afin de découvrir de nouvelles cytokines aux propriétés biologiques intéressantes et potentiellement plus actives que celles déjà connues, la société GenOdysée, a étudié les variants des gènes codant pour différentes cytokines (notamment les interférons) dans la population humaine. Un criblage des gènes a ainsi permis d'identifier des polymorphismes nucléotidiques naturels uniques. Les protéines correspondantes aux gènes possédant ces polymorphismes nucléotidiques ont été synthétisées. A partir d'une banque d'ADNc constituée de l'ADN génomique provenant de 239 individus, représentant 85% de la diversité génétique humaine (Figure 84), la présence de polymorphismes nucléotidiques uniques a été recherchée dans les gènes des différents IFN- α . Les polymorphismes provoquant un changement dans la séquence en acides aminés ont été sélectionnés et l'impact de ces mutations sur la structure tridimensionnelle des protéines d'IFN- α variants (notés GEA00XX) en résultant, a été prédite par des outils de modélisation.

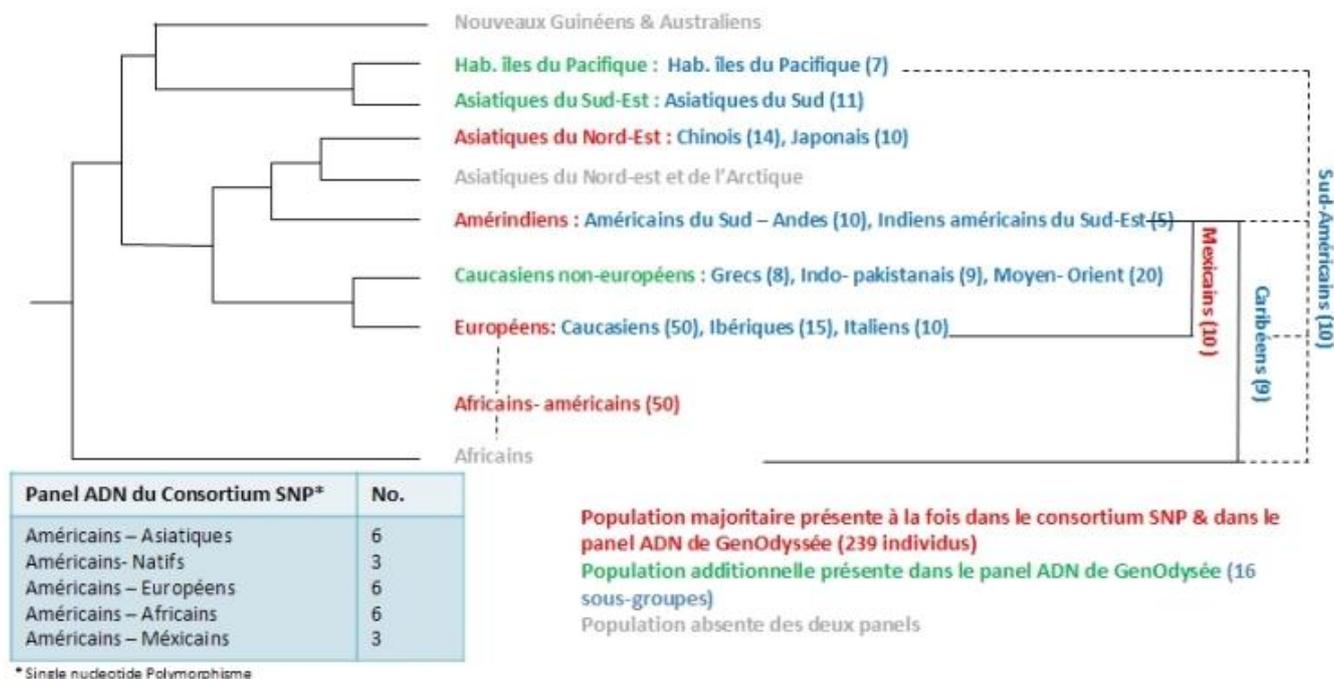


Figure 84 : Relation phylogénétique déduite du panel de population de GenOdysée. Adapté de : (Cavalli-Sforza *et al.*, 1994)

Les IFN- α variants GEA007.1, GEA009.2, GEA011.1 et GEA013.1 sont des mutants naturels des IFN- α 17, - α 21, - α 5, et - α 7, respectivement et diffèrent de ces derniers par la mutation d'un acide aminé (Tableau 3). Le GEA007.1 diffère de la protéine d'IFN- α -17 par un seul acide aminé (substitution la Glycine 45 en Arginine). Cette modification d'acide aminé modifie la structure tridimensionnelle de la protéine. Les IFN- α variants ont été produits en utilisant le système de levures *Pichia pastoris*. L'IFN- α 2b a été produit dans ce système, dans les mêmes conditions que les IFN- α variants, et correspond alors à l'IFN- α -2WT.

Swiss-Prot	Gène IFN- α humain	Mutation	Protéine IFN- α variant
P01571	17	G45R	GEA007.1
P01567	7	D95N	GEA013.1
P01563	2b	Aucune	IFN- α 2WT
P01569	5	C122S	GEA011.1
P01568	21	K179E	GEA009.2

Tableau 3 : Comparaison de la séquence en acides-aminés des IFN- α variants étudiés.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Nous avons alors cherché à **évaluer l'effet inhibiteur de différents IFN- α variants** dans le modèle du réplicon sous-génomique du VHC (lignée BM4-5) en comparaison avec l'IFN- α 2WT et à **comprendre les mécanismes d'action du variant le plus actif**, GEA007.1, en essayant d'expliquer sa capacité à éliminer à long terme des cellules le réplicon VHC et son activité inhibitrice supérieure.

C - RESULTATS

Activité antivirale des IFN- α , - β et - γ en monothérapie dans la lignée des réplicons BM4-5

Les interférons- α , β , et γ inhibent la réplication de l'ARN sous-génomique du réplicon VHC (lignée BM4-5). L'IFN γ a un effet antiviral qui paraît particulièrement important. Les résultats sont présentés Figure 85 ci-dessous.

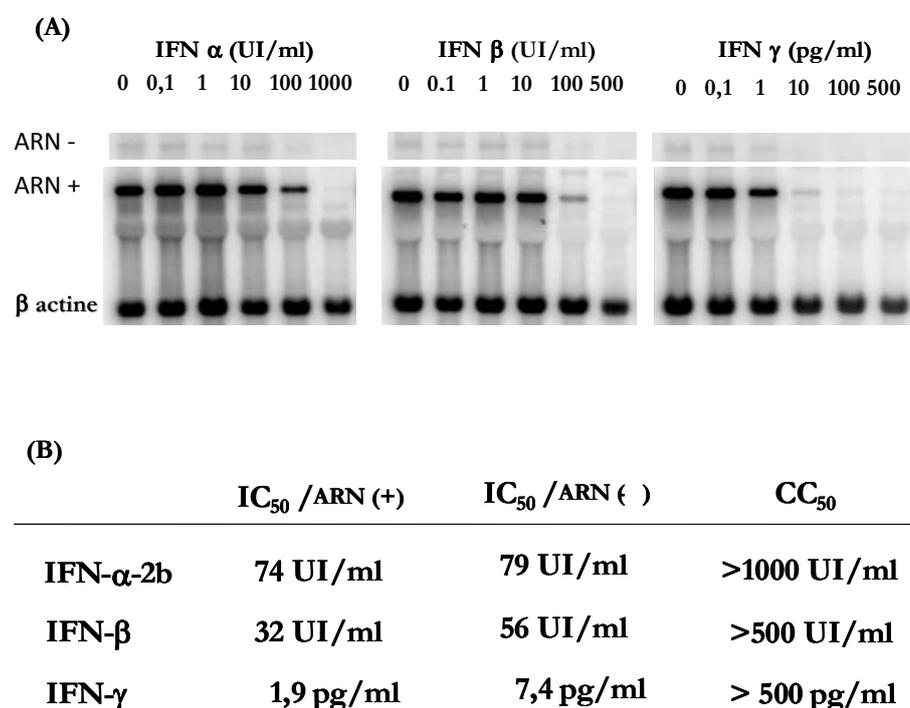


Figure 85 : Inhibition de l'ARN sous-génomique du VHC (lignée BM4-5) par les IFN- α , β , et γ .

(A) L'IFN- α -2b (Introna®), l'IFN- β humain recombinant (Sigma) et l'IFN- γ humain recombinant (Sigma) ont été administrés pendant 3 jours consécutifs à différentes doses. A la fin du traitement l'ARN a été extrait et l'ARN du VHC a été quantifié après Northern Blotting. Les expériences ont été réalisées en duplicata.

(B) Effet antiviral et cytotoxicité des IFN- α 2b, β et γ

Le variant GEA007.1 inhibe la réplication de l'ARN sous-génomique du VHC de façon plus importante que l'IFN- α 2WT et que les autres IFNs- α variants

Les cellules BM4-5 ont été traitées pendant trois jours consécutifs par des concentrations croissantes des différents IFN- α . Cette expérience a été réalisée trois fois en triplicata. Après extraction de l'ARN cellulaire total et révélation par Northern blot des ARN du VHC de polarités négative et positive relativement à l'ARNm de la β actine, les moyennes des IC₅₀ des différents IFN ont été déterminées pour les différentes expériences. L'ordre d'activité des IFN est le suivant avec les IC₅₀ moyennes indiquées entre parenthèses : GEA007.1 (22,7 pg/ml) > GEA013.1 (95,6 pg/ml) > IFN- α -2WT (154,2 pg/ml) > GEA011.1 (187,9 pg/ml) > GEA009.2 (483,3 pg/ml). La meilleure activité antivirale du GEA007.1 est aussi flagrante lorsqu'on compare les IC₉₀ des différents interférons. (471pg/ml vs 3080pg/ml pour l'IFN- α 2WT).

➔ VOIR FIGURE 1 ET TABLEAU 1 DE L'ARTICLE.

Le traitement prolongé des cellules BM4-5 par le GEA007.1 permet d'éliminer l'ARN du VHC

Le traitement des cellules BM4-5 pendant 20 jours (les cellules étant repiquées au quart lorsqu'elles sont à confluence) par 333 pg/ml de GEA007.1 en absence de généticine a permis d'éliminer l'ARN du VHC des cellules BM4-5, tandis qu'un traitement selon le même protocole par l'IFN- α 2WT a fait diminuer l'ARN viral mais ne l'a pas supprimé. En effet, à l'arrêt du traitement par IFN- α , seules les cellules non traitées ou ayant été traitées par l'IFN- α 2WT survivent en présence de généticine.

[→ VOIR FIGURE 2 DE L'ARTICLE](#)

Le GEA007.1 induit de façon plus efficace que l'IFN- α 2WT les protéines issues de la transduction du signal par l'IFN- α

Les cellules BM4-5 ont été transfectées avec un plasmide rapporteur contenant un élément de réponse à la stimulation par un interféron (ISRE) localisé en amont d'un gène codant la luciférase. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été soit laissées sans traitement, soit traitées par une gamme d'IFN- α -2WT ou d'IFN ν , de 0,3 ; 3 ; 33 ; 333 ou 3333pg/ml. L'activité luciférase a été mesurée 24h plus tard et les résultats obtenus ont été normalisés à ceux obtenus avec l'IFN- α -2WT. Les résultats obtenus montrent une meilleure activation des voies IFN par GEA007.1. Elle est trois ou deux fois supérieure à celle obtenue avec l'IFN- α 2WT aux concentrations de 33pg/ml et 333pg/ml respectivement. Aux concentrations plus élevées, la différence s'estompe, probablement du fait de la saturation des récepteurs. Nous avons donc poursuivi nos études en travaillant à une concentration de 33pg/ml. D'autres cellules BM4-5 ont été traitées par l'IFN- α 2WT ou le GEA007.1 à la concentration de 33 pg/ml. Les protéines cellulaires totales ont été recueillies à des temps successifs et les protéines PKR et p48 notamment ont été révélées par Western blot. L'expression de ces protéines est induite de façon plus importante par le GEA007.1 par rapport à l'IFN- α 2WT.

Ces deux résultats suggèrent une efficacité plus grande de la transduction du signal par le GEA007.1 par rapport à l'IFN- α -2WT.

[→ VOIR FIGURE 3 ET FIGURE 4 DE L'ARTICLE](#)

L'expression intracellulaire des gènes spécifiques de l'IFN- α est plus importante après traitement par le GEA007.1 qu'après traitement par l'IFN- α 2WT

Pour élargir les résultats obtenus en Western Blot et pour essayer d'avoir une vue globale des différences observées dans la transduction du signal déclenché par l'IFN- α 2WT et GEA007.1, l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISGs) a été analysée quantitativement par des puces. L'analyse montre une activation globalement plus importante de la voie de transduction du signal par le GEA007.1 comparée à l'IFN- α 2WT. La plus grande activité antivirale du GEA007.1 est donc reliée à une transduction plus efficace du signal, probablement liée à une interaction particulière avec le récepteur des IFN de type 1 en fonction de la séquence en acides aminés propre à chaque IFN.

[→ VOIR TABLEAU 2 DE L'ARTICLE](#)

D - DISCUSSION

Aujourd'hui, bien qu'en attente d'un usage clinique de nouvelles molécules actuellement en développement, l'IFN- α demeure un composant majeur du traitement de l'hépatite C. Son usage restera d'ailleurs probablement obligatoire en combinaisons avec de nouveaux inhibiteurs du VHC en prévision de l'apparition de résistances (Fried *et al.*, 2002). Cependant, l'IFN- α 2b ou α 2a n'est pas efficace dans tous les cas et l'on observe de nombreux cas de patients non-répondeurs ou qui échappent à la bithérapie actuelle. Différents facteurs peuvent expliquer cette résistance, incluant des facteurs virologiques et des facteurs génétiques de l'hôte. Ainsi le génotype 1 est associé à des taux de réponse plus faible que les génotypes 2/3 (Fried *et al.*, 2002; Manns, 2001), et des facteurs génétiques de l'hôte (âge, sexe,...) peuvent influencer le taux de réponse aux thérapies basées sur l'interféron (Chen *et al.*, 2005; Kinzie *et al.*, 2001).

L'objectif initial de ce travail était de déterminer si de nouveaux interférons, avec une activité améliorée contre le génotype 1 du VHC, pouvaient être identifiés parmi des IFN variants ayant une activité antivirale dans des cellules infectées par le VSV (Virus de la Stomatite Vésiculaire) et vis-à-vis de l'EMCV (Virus de l'Encéphalomyocardite) chez des souris infectées *in vivo* (Tovey *et al.*, données non publiées). Le résultat principal de notre travail est la **plus grande efficacité antivirale de GEA007.1** et dans une certaine mesure de GEA0013.1 comparé à l'IFN- α 2b dans le modèle de réplicon sous-génomique du VHC, avec une IC₅₀ pour le GEA007.1 environ sept fois plus faible que celle de l'IFN- α -2WT. Cette activité plus importante a permis la clairance du VHC par le GEA007.1 après une administration prolongée, alors que l'IFN- α -2WT administré dans les mêmes conditions n'a pas totalement éliminé l'ARN viral.

Ces résultats sont en accord avec les études montrant que les voies de transduction induites par les IFN- α sont qualitativement fonctionnelles dans les cellules Huh-7, et que la présence des réplicons ne perturbe pas ces voies de transduction (Hayashi *et al.*, 2005; Melen *et al.*, 2000; Zhu, 2003).

La plupart des gènes comme ADAR, IFI6-16 (G1P3), ISG56 (IFIT1), Mx1, PKR, IFI27, ISG15 (G1P4), identifiés par les puces comme induits par le traitement par IFN- α , ont également été décrits dans d'autres études (Cheney *et al.*, 2002; Mihm *et al.*, 2004; Zhu, 2003). Mx1 est le gène qui a été le plus induit dans notre système. *In vivo*, Mx1 (aussi appelé MxA) est exprimé à un niveau élevé dans le foie et dans les PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) de patients atteints d'hépatite C (Mihm *et al.*, 2004). De plus, une forte expression hépatocellulaire de Mx1 avant traitement est prédictive d'une non réponse au traitement par IFN- α et ribavirine (MacQuillan *et al.*, 2002). Ce résultat suggère que la réplication du VHC persiste malgré une forte expression de Mx1 et est en accord avec l'absence de rôle de Mx1 dans l'inhibition de la réplication du VHC dans le modèle des réplicons. L'augmentation de Mx1, tant lors de l'infection *in vivo* que dans nos expériences reflète donc seulement l'activation de la voie de signalisation de l'IFN- α .

L'activité biologique des IFN est lié à leur capacité d'induction des voies de transduction de signal et dépend donc de leur affinité pour leur récepteur. Les différences des séquences en acides aminés entre les différents IFN- α variants peuvent expliquer une affinité particulière de GEA007.1 pour le récepteur des IFN- α et une plus grande capacité d'induction du signal. Nos résultats montrent que la différence d'activité entre IFN- α -2b et GEA007.1 n'est pas liée à l'activation d'un gène particulier mais au fait que la cascade de signalisation dans son ensemble est plus efficacement activée par GEA007.1. Différentes hypothèses ont permis d'établir que le mécanisme d'action anti-VHC de l'IFN- α est dépendant d'une voie Jak-STAT et de protéasomes fonctionnels. Les voies dépendant des ARN double-brin, comme celle de la PKR ou de la RNaseL, ne semblent par contre pas impliquées (Guo *et al.*, 2003b). Le programme antiviral induit par l'IFN- α ciblerait directement la traduction dirigée par l'IRES du VHC, conduisant à la réduction de la synthèse protéique virale. Du fait du lien étroit entre traduction, assemblage des complexes de réplication et synthèse de l'ARN viral, l'IFN- α inhibe également l'amplification de l'ARN viral (Guo *et al.*, 2004).

E - CONCLUSION

En conclusion, cette étude a montré que l'IFN- α variant GEA007.1 a une activité inhibitrice sur la réplication de l'ARN du VHC plus puissante que celle de l'IFN- α 2b, dans le modèle du réplicon sous-génomique du VHC. Cette activité antivirale est associée à une induction plus importante des voies de transduction du signal et a permis d'éliminer le VHC des cellules après une administration prolongée.

Ces résultats suggérant une affinité plus grande pour le récepteur, il serait intéressant de poursuivre l'évaluation de ces composés, notamment lors d'essais cliniques, afin de savoir si l'augmentation d'activité *in vitro* s'accompagne d'un bénéfice clinique. Dans ce contexte, la **détermination de l'activité du composé chez les non-répondeurs** et l'étude de la **possibilité de diminution des dosages**, dans l'objectif de diminuer les effets secondaires liés à l'IFN, seraient des pistes intéressantes de recherche.

De courts « Peptide Nucleic Acids » (PNA) inhibent *in vitro* la traduction dépendante du site interne d'entrée du ribosome (IRES) du virus de l'hépatite C.

Amaury Martin¹, David Durantel¹, Sergio A. Caldarelli², Christine Alotte¹, Audrey Di Giorgio², Nadia Patino², Roger Condom², Fabien Zoulim¹, and Olivier Hantz^{1*}

¹ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1, IFR 62, Lyon, F-69372 ; INSERM, U271, Virus des hépatites et pathologies associées, Lyon, F-69424, France.

² Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes UMR-CNRS 6001, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, Nice, F-06108, France.

Short Peptide Nucleic Acids (PNA) inhibit hepatitis C virus Internal Ribosome Entry Site (IRES) dependent translation *in vitro*.

Soumis pour publication en Décembre 2006 dans [Antiviral Research](#).

A - ARTICLE

Short Peptide Nucleic Acids (PNA) inhibit hepatitis C virus Internal Ribosome Entry Site (IRES) dependent translation in vitro.

Amaury Martin¹, David Durantel¹, Sergio A. Caldarelli², Christine Alotte¹, Audrey Di Giorgio², Nadia Patino², Roger Condom², Fabien Zoulim¹ and Olivier Hantz^{1*}.

¹ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1, IFR 62, Lyon, F-69372 and INSERM, U271, Virus des hépatites et pathologies associées, Lyon, F-69424, France.

² Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes UMR-CNRS 6001, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, Nice, F-06108, France.

Running title: In vitro inhibition of HCV IRES dependent translation by short PNA

*To whom correspondence should be addressed:

Dr. Olivier Hantz

INSERM U271

151, cours Albert Thomas

69424 Lyon cedex 03

FRANCE

Phone: +33 (0)4 72 68 19 70

Fax: +33 (0)4 72 68 19 71

Email: hantz@lyon.inserm.fr

SUMMARY

The internal ribosome entry site (IRES) of hepatitis C virus (HCV) which governs the initiation of protein synthesis on viral RNA is well conserved among all HCV genotypes and thus represents an ideal target for antisense approaches. Using an original bicistronic plasmid, we first established that the sequence and translational activity of HCV IRESs cloned from six patients, responders or not to combination therapy, was conserved. We then tested the hypothesis that second generation antisense molecules, i.e. short Peptide Nucleic Acids (PNA), could inhibit HCV translation by binding to the highly conserved III_d or IV loop regions of the IRESs. Five 6-10mer PNAs were designed. They strongly inhibit HCV IRES-driven translation in a rabbit reticulocyte lysate assay with an IC₅₀ value of 54nM for the best PNA. This inhibition was highly specific since corresponding PNAs with only one mismatch were inactive. Short phosphorothioate oligonucleotides of same sequence were unable to inhibit HCV translation. Finally, despite inefficient uptake in living cells, a PNA molecule was shown to have anti HCV activity in Huh-7.5 cells when electroporated with a full-length HCV genome construct. In summary, we have demonstrated *in vitro* the potential of short PNA molecules directed against the HCV IRES.

INTRODUCTION

Worldwide, 170 million people are infected by hepatitis C virus (HCV) and in more than 70% of the cases the virus causes persistent infection that predisposes carriers to the development of liver diseases, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Poynard et al., 2003; Seeff, 2002). The average Sustained Viral Response (SVR) to treatments based on the association of pegylated alpha interferon 2a or 2b and ribavirin is 50-60% (Fried et al., 2002; Manns, 2001). However, this therapy is often poorly tolerated because of significant side effects (Manns, Wedemeyer, and Cornberg, 2006). Thus, numerous efforts to develop new therapies are in progress to overcome the failure of current treatments (Pawlotsky, 2006).

HCV, a member of the *Flaviviridae* family, is a single-strand positive-sense RNA virus (Choo et al., 1989). The virus genome is 9,600 nucleotides long and encodes a polyprotein of approximately 3000 residues and an alternate reading frame that overlaps the core protein gene (Walewski et al., 2001). Initiation of translation depends on a cap-independent mechanism, mediated by an internal ribosome entry site (IRES) located in the 5'UTR region of the viral RNA (Tsukiyama-Kohara et al., 1992). Despite an overall high genetic variability of HCV (Smith et al., 1995), it has been shown that the IRES sequence is highly conserved. It was possible to define a single predicted RNA secondary structure of the IRES which contains three stem-loops (II to IV) and a pseudoknot (Figure 1A) (Honda et al., 1999; Honda, Brown, and Lemon, 1996) as a necessary condition to maintain its activity (Thelu et al., 2004). Therefore, it is an attractive drug target for antisense based therapeutical approaches.

Several groups have already tested antisense oligonucleotides that inhibit HCV RNA and polyprotein synthesis both *in vitro* and in mouse models (Alt et al., 1999; Brown-Driver et al., 1999; Hanecak et al., 1996; Lima et al., 1997; Mizutani et al., 1995; Seki and Honda, 1995; Vidalin et al., 1996; Wakita and Wands, 1994; Zhang, 1999). Phase I/II clinical trials based on a phosphorothioate (PS-ODN) molecule (ISIS14803) were also initiated but were stopped for reasons of lack of efficacy (McHutchison et al., 2006). More generally, antisense oligonucleotides used until recently were first generation oligonucleotides that are generally sensitive to nuclease degradation, show low affinity profiles towards their target and show side effects when used *in vivo* (Crooke, 2004).

Second generation antisense oligonucleotides may improve the efficacy of such approaches. They possess modifications both on the sugar and the backbone and have already shown *in vitro* activity against HCV (McCaffrey, 2003; Tallet-Lopez et al., 2003). Nevertheless, the development of effective new therapeutical agents to control HCV infection is required and may be provided by another class of antisense molecules, i.e. Peptide Nucleic Acids (PNA).

PNA are nucleic acid analogues containing natural nucleoside bases on a pseudo-peptide backbone (Nielsen et al., 1991). They can bind efficiently to DNA and RNA sequences and were shown to efficiently inhibit mRNA translation by binding to the entry site for the ribosomal small subunit (Doyle et al., 2001).

Here we tested the hypothesis that short PNAs of 7 – 10 nucleotides in length targeted to the HCV IRES III_d stem-loop region or to the IV loop region that contains the AUG start codon could inhibit in vitro HCV translation both in a Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) assay and in cultured Huh-7.5 cells transfected with full length HCV genome RNA transcripts.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction

Constructions were carried out using standard molecular cloning techniques (Sambrook and Russell, 2001). The bicistronic plasmid termed pFI-hRI is based on a pCDNA3.1 (+) backbone (Invitrogen). Sequences coding for Firefly Luciferase (Fluc) were obtained from pGL3 basic (Promega). A HindIII – EagI fragment (containing the Fluc coding region) was PCR amplified using specific primers (HindIII-Fluc_Fwd : CCCAAGCTTATGGAAGACGCCAAAAACATA and EagI-Fluc_Rv : ATAGTTTAGCGGCCGCTTACACGGCGATCTTCCGCCCTTC). After restriction with HindIII and EagI as recommended by the manufacturers (Promega and New England Biolabs), the amplification product was inserted between the HindIII and NotI sites of pCDNA 3.1(+), downstream of CMV and T7 promoters, thereby generating the intermediate construct pFI. Next, an XbaI – ApaI fragment (containing the humanized Renilla Luciferase coding region, hRluc) was obtained by PCR amplification of pRLuc-SV40 (Promega) using specific primers (XbaI-hRluc_Fwd: GCTCTAGAATGGCTCCAAGGTCTACGACC and ApaI-hRluc_Rv: GCTGGGCCCTTACTGCTCGTTCTTCAGCAC). After restriction with XbaI and ApaI as recommended by the manufacturer (Promega), the amplification product was inserted downstream from the Fluc sequence, thereby generating the construct pFI- hRI. (Figure 1C). The junction between the end of the Fluc sequence and the beginning of the hRluc sequence was analysed among the different clones (using primers vc_Fwd : TGTGGACGAAGTACCGAAAGGTC and vc_Rv : ATGGCTGGCAACTAGAAGGCA) by direct and reverse sequencing of the region (Genome Express, France). Ligation reactions were carried out using T4 DNA ligase (Promega). The E. Coli DH5 α strain was used for plasmid transformation and propagation.

Patients

Six patients chronically infected by HCV, treated with a combination of interferon α -2b and ribavirin, were retrospectively included in the study. Three patients were sustained responders and three patients were non-responders. Sustained response was defined as a decrease of HCV RNA titers below the detection limit with a normalisation of ALT levels, which were maintained after the end of the treatment. Non-response was defined as no decrease of HCV RNA titers or a decrease of less than one log₁₀ copies/ml, during and after treatment without a fall of ALT to the normal range. For sustained responder patients, a sample in the first month of treatment, before disappearance of RNA, was used for RNA extraction. In the case of non-responder patients, RNA from one serum sample at month 6 was studied. All patients were infected by genotype 1 HCV.

RNA extraction, amplification of HCV IRES and preparation of bicistronic plasmids.

HCV RNA was extracted from the sera using the QIAmp viral RNA Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. The 5'UTR was reverse transcribed and amplified using Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) and the set of primers determined from the IRES region (primer IRESfwd 5' ggcggccgGCGACTCC(G/A)CCATGAAT 3' containing an EagI cloning site shown in lower-case letters and IRESrv 5' cgtctagaAGGATTCGTGCTCATGGTGC 3' containing an XbaI cloning site). These primers amplified fragments from nt 19 of the 5'UTR to nt 341. The RT reaction was performed for 30min at 60°C followed by 15min at 95°C. PCR was carried out for 40 cycles (94°C, 30 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 30 sec). RT-PCR reactions were performed on I-Cycler (BioRad). The final PCR products were analyzed by

electrophoresis on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and observed under UV light. The PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) as specified by the manufacturer and quantified by UV spectrophotometry. The fragments and the bicistronic plasmid were digested with *EagI* and *XbaI*. Ligation was performed overnight using T4 DNA ligase (Promega) as specified by the manufacturer. XL2 bacteria were transformed with ligation products. Plasmids are labelled pFI-hRI SR or NR respectively for Sustained Responders and Non Responders. Sequencing was performed (Genome Express, France) after preparation of the plasmids to ensure that the integrity of the sequence was conserved.

In vitro coupled transcription and translation assay

To assay IRES activity, we used TnT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). Briefly, instead of performing *in vitro* RNA synthesis using T7 polymerase followed by *in vitro* translation in a Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL), we added 1 µg of circular bicistronic plasmid in 25 µl of TnT T7 Quick Master Mix (includes RRL, Buffer, T7 RNA polymerase, aa mixture met-, RNasin) supplemented with 1 µl of methionine and incubated for 90 min at 30°C. The synthesized proteins were analyzed by luciferase assay.

Cell culture and transfection

To assay the construct in cell culture, Huh-7 cells (Nakabayashi, 1982) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). Subconfluent monolayers of cells in 24-well plates (15 mm diameter) were transfected with 1 µg of bicistronic plasmid DNA in 500 µl OptiMEM containing 3 µl FuGene-6 (Roche). Four replicate wells were transfected with each construct and each experiment was performed at least twice. After two hours incubation at 37 °C, 1 ml of growth medium was added to the wells. The cells were harvested 24 h later and cell lysates were assayed for luciferase activity as described below. Electroporation of RNA transcripts was performed in Huh-7.5 cells, an Huh-7 derivative that is highly permissive for HCV replication (Blight, McKeating, and Rice, 2002). HCV RNA was transcribed *in vitro* from replicon I389/NS3-3'/LucUbiNeo-ET (kindly provided by Pr. Ralf Bartenschlager) (Kronke et al., 2004) or the HCV luc-JFH1 full length genome construction (Wakita et al., 2005) and electroporated into cells as described previously (Blight, McKeating, and Rice, 2002). In brief, RNA transcripts (5 µg) were mixed with 2×10^6 washed cells in 0.2 ml in a 2-mm gap cuvette and immediately pulsed (820 V, 99-µs pulse length, five pulses at 1.1s intervals) using a BTX ECM 830 square wave electroporation system (Genetronics, San Diego, Calif.). Electroporation was performed with RNA alone or RNA mixed with a range of PNA-10 or PNA control of 6.5, 13, 20 and 26 nM. The cells were seeded into 24-well plates and were harvested at 24 h, 48h and 72h after plating. Cell lysates were assayed for luciferase activity as described below. Experiments were performed twice in duplicates.

Luciferase Assay

The enzymatic activities of Fluc and hRluc were measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). For RRL or TnT *in vitro* assays, 2.5 µl of reticulocyte lysate were analysed for each experiment with sequentially programmed addition of 50 µl of Luciferase Assay Reagent 2 and 50 µl of Stop & Glo. The ratio of hRluc activity to Fluc activity was presented in arbitrary units as the relative luciferase activities. Light emission was integrated over a period of 1 sec in a Luminoskan Ascent, with 1 sec of lag time between readings. Similar quantifications were performed after transfection of bicistronic plasmids in cell culture or electroporation of HCV RNA from the subgenomic luciferase replicon or the Luc-JFH1 construct. In these cases, after removing the growth medium from the cultured cells and washing the surface of the culture vessel with PBS, the minimum volume of Passive Lysis Buffer (PLB) recommended by the manufacturer (Promega) was dispensed into each culture well. For cultures performed in 24-well culture plate, 125 µl of PLB was added. After 15 min at room temperature, the lysate was transferred to a tube and 10 µl were analysed in the conditions described above.

Peptide Nucleic Acid and Phosphorothioate oligonucleotide synthesis

All PNAs (except PNA-10-scramble and PNA-10-fluo) used in this study were synthesized using the standard synthesis protocol (Christensen et al., 1995). Phosphorothioate oligonucleotides and PNA-10 scramble were purchased from Eurogentec (Angers – France). All molecules were purified and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Their targets on the predicted HCV IRES secondary structure (Honda et al., 1999) are indicated in Figure 1A. Figure 1B summarizes the sequences of the different PNAs.

RESULTS

Comparison of the translational efficiencies of 5'UTRs in vitro and in cultured cells

To analyse IRES activities both after in vitro translation and in Huh-7 transfected cells, a novel bicistronic plasmid allowing easy cloning and measurement of the biological activity of IRES in HCV isolates obtained from infected patients was constructed. The constructs used include the sequence from nt 19 of the 5'UTR to nt 15 of the core protein (nt 356 of the HCV genome). pFI-hRI, represented in Figure 1C, has a bicistronic translational unit controlled by a composite CMV/T7 promoter. Rather than the classic Renilla luciferase gene, a humanized Renilla sequence was used as a reporter gene for the monitoring of HCV IRES activity because of its supposedly improved translational activity levels (manufacturer's data). Effectively, in the Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL) system, using a construct with an HCV-H77 reference strain IRES (genotype 1a), whereas the ratio of Renilla luciferase to Firefly luciferase activity was about 0.4 when the humanized Renilla gene was used, it was only about 0.1 with the unmodified gene (data not shown).

The IRESs from the selected patients (three sustained responders and three non responders, all infected with HCV genotype 1) were isolated and cloned into the bicistronic pFI-hRI and all constructs were sequenced. Very few differences between the sequences were observed (Table 1). When positioned onto the predicted IRES secondary structure, two were found to lie in unpaired regions of the IRES (C204A and C204U). The importance of maintaining the secondary structure of the IRES is shown by the other substitutions located in paired regions and which improve base-pairing (U78C and G107A). No differences were observed in the IIIId and IV loop regions.

The IRES activities of these different isolates were analyzed both in vitro in RRL and after transfection in Huh-7 cells. Results are summarized in Table 1. In both cases, no significant statistical difference of IRES activity was observed between the different constructs. Taken together, these results confirmed that the IRES of HCV is a highly conserved region at the nucleotide level and does not present inter-individual variations in activity.

Inhibition of IRES dependent translation in vitro by Peptide Nucleic Acids

The capacities of PNAs to inhibit the translation of HCV RNA were evaluated in the in vitro TnT coupled Transcription/Translation system using the construct pFI-hRI NR1. The IRES derived from NR1 patient was identified as being of genotype 1b HCV. Non-specific inhibitory effects were evaluated with the same construct by measuring the IRES independent translation of Firefly luciferase.

Among the five PNAs studied, four showed a dose-dependent inhibitory effect. Inhibitions obtained using PNAs targeted to both regions, the IIIId stem-loop region (PNA 7, 8 and 9) and the IV stem-loop region (PNA-10 and 11), are shown in Figure 2A. PNA-7 did not show an inhibitory effect at the tested concentrations. PNA-8, 9 and 11 exhibited a specific inhibitory effect with IC50s calculated respectively at 100nM, 100nM and 250nM. PNA-10 was the most effective with an IC50 estimated at 54nM and an IC90 at 100 nM. Concentrations exceeding 1µM led to non specific inhibition as indicated by significant effects on Firefly luciferase expression. As a control, a scrambled PNA was also used and showed no inhibitory activity. As PNA can target RNA as well as DNA, we sought to determine whether the effects observed were associated in our experimental conditions to an inhibitory activity of the PNA on the RNA template. We therefore performed an analysis using in vitro transcribed RNA from pFI –hRI NR1 in standard RRL.

Similar results were obtained with similar IC₅₀ values (data not shown). We also performed northern blotting on the TnT lysate after performing in vitro coupled translation and transcription. No modification of size or amounts of the transcripts was observed. (data not shown).

The influence of mismatched nucleotides was then analysed. We introduced only one mismatch nucleotide into the sequences of PNA-8, targeting the IIIId loop region (GGG triplet) and PNA-10, targeting the IV loop region (AUG start codon). Figure 2B shows a 10-fold reduction of efficiency for mismatch PNA-8 compared to control PNA (IC₅₀ values increasing from 100nM to 1µM). For PNA-10 (Figure 2C), only one mismatch in the sequence pairing with the AUG start codon led to a clear decrease of inhibitory activity (IC₅₀ values increasing from 54nM to 100nM).

Lastly, we compared PNAs to PS-ODNs of the same sequence and length. Only one PS-ODN, corresponding to the most effective PNA-10, showed an inhibitory effect with an IC₅₀ value of 4µM (Figure 3). This represents a seventy fold increase of IC₅₀ compared with PNA-10. Other PS-ODNs did not have any effect, consistent with other work showing that PS-ODNs must have a length of at least 20nt and be used at higher concentrations to be effective.

Inhibition of IRES dependent translation in cultured cells.

The question of whether these short PNAs could have an effect in cellular models was then asked. Huh-7 cells were first transfected with pFI-hRL-NR1 and then PNA-10 was transfected while the cells were still transiently expressing Firefly and h*RENILLA* luciferases. Results were normalized against h*RLUC* activity. However, no inhibition was observed (data not shown). We then performed assays with a fluoresceine labelled PNA-10. It appeared that neither transfection with cationic lipids nor electroporation of PNA alone or with the bicistronic plasmid allowed penetration of PNA into cultured cells (data not shown). We therefore performed electroporation of PNA mixed with an RNA transcript from an in vitro-transcribed full length HCV genome construct (Wakita et al., 2005). Three different concentrations of PNA-10, i.e. 6.5, 13 and 26nM, corresponding to a ratio PNA/HCV-RNA of 65, 125 and 250 respectively were used. In this experiment (Figure 4), PNA-10 showed a dose dependent inhibition in the establishment of the JHF1 complete replication cycle, up to 65% relatively to control at a concentration of 26nM. By comparison, a scrambled PNA-10 did not show any significant effect. These results strongly suggest that the tested PNA was unable to enter living cells in physiologically relevant concentrations unless it is associated with a single stranded RNA molecule harboring a complementary sequence.

DISCUSSION

While waiting for the clinical use of new anti-HCV molecules which are now in the late development stage, the design of original and complementary antiviral approaches seems important, especially in the perspective of combating and preventing the emergence of drug resistant mutants. Indeed, new anti-HCV agents that target the viral polymerase or protease (De Francesco and Migliaccio, 2005), induce a rapid emergence of resistant mutants, both in vitro in the replicon system and in vivo in the first phase I/II clinical trials (Dutartre et al., 2006; Le Pogam et al., 2006; Mo et al., 2005). In this context, the IRES of HCV represents an interesting target, since it is the most conserved region among all HCV genotypes and the least susceptible to mutation.

In this study, we first analysed the sequence and translational activity of IRES obtained from different clinical isolates. Very low sequence variability and low variation of translational activity was observed. These observations are in agreement with other studies that showed that sequence variability of IRES does not appear to correlate with any difference in levels of HCV replication in vitro and in cell culture (Thelu et al., 2004) and does not depend on the response status of the patients (Soler et al., 2002). This further confirms the potential of an antisense based strategy targeted against IRES as an alternative approach for the treatment of non responder patients, either to IFN based therapy or to future combination therapy including polymerase or protease inhibitors.

Previous studies have demonstrated that the HCV IRES could be inhibited *in vitro* by a wide range of antisense based molecules, notably including ribozymes, siRNA and oligonucleotides (Alt et al., 1999; Brown-Driver et al., 1999; Hanecak et al., 1996; Lima et al., 1997; Mizutani et al., 1995; Seki and Honda, 1995; Vidalin et al., 1996; Wakita and Wands, 1994; Zhang, 1999). The ability of such molecules to inhibit HCV replication in cell culture or *in vivo* was also demonstrated, although with poor results and selectivity (Crooke, 2004; McHutchison et al., 2006). Second generation antisense oligonucleotides may improve the efficacy of such approaches. Some have already shown *in vitro* activity against HCV (McCaffrey, 2003; Tallet-Lopez et al., 2003). Nevertheless, the development of effective new therapeutic agents to control HCV infection is required and may be provided by another very promising class of antisense molecules, i.e. Peptide Nucleic Acids (PNA). They have an improved selectivity and affinity to DNA or RNA and lower affinity to proteins compared to phosphorothioate oligonucleotides (PS-ODN) and are highly resistant to nuclease and peptidase degradation (Demidov et al., 1994). They have been used as antisense molecules against various viruses such as HIV (Schwergold et al., 2002) or HBV (Robaczewska et al., 2005). Here, we have analysed the inhibitory effect of short PNAs (6-10 mers) for their ability to specifically inhibit HCV IRES-driven translation by binding to the IIIId or IV loop regions of IRES

Among the six PNAs designed, five were found to be effective for inhibiting the HCV IRES-dependent translation. PNA-10 was the best molecule tested with an IC₅₀ of 54nM in RRL. This inhibition appeared highly specific since PNA molecules with only one mismatch lost their inhibitory activity. Furthermore, no inhibition of Firefly luciferase activity was observed in the range of concentrations that effectively inhibited Renilla luciferase activity. In our constructions, Firefly luciferase translation is cap-dependant and not IRES-dependant, and any inhibition would reflect non-specific side effects. Moreover, we found that phosphorothioate analogues of the same length and sequence are generally inefficient. Only the PS-ODN corresponding to the most efficient PNA was found to be effective, with an IC₅₀ of 4µM that is seventy times higher than the IC₅₀ obtained with PNA-10. Results obtained by electroporating PNA-10 with luc-JFH1 RNA in Huh-7.5 cells showed an inhibition of the establishment of the HCV replication cycle in a dose dependent manner that is also specific since a scrambled PNA was ineffective. Taken together, these results demonstrate the efficacy of short PNA directed against the HCV IRES in an *in vitro* system and in cell culture.

Unfortunately, we were not able to show a similar effect when electroporating PNA by itself into cells already replicating JFH1 HCV. Similar results were obtained in the luciferase-replicon system (data not shown). Also, we cannot exclude that PNA-10 enters the cell and exhibits an inhibitory activity when electroporated with the target RNA because it enters bound to the RNA while the scrambled PNA-10, which is unable to bind to the RNA, may not be able to enter the cell. Chemical neutrality leading to poor cellular uptake without an appropriate delivery system is the major drawback of PNA as confirmed in our study. Many systems have been developed to allow an efficient delivery into cells, but none seems to be ready to use (Rasmussen et al., 2006).

PNA length appears critical since all compounds less than 10-mer that we have tested are far less efficient. It has been calculated that lengths under 17 nt can statistically match with more than one target in cellular genes (Branch, 1998). Operationally, long PS-ODNs were used because of the duplex T_m that was inferior to natural double-stranded DNA and thus needed to be longer than 17-20nt to bind efficiently to RNA targets (Crooke, 1993). With PNA, such thermodynamic limitations disappear since they bind more efficiently DNA and RNA (Lundin et al., 2006). Efficient inhibition of HCV IRES directed translation with PNA molecules (16-23 mer) longer than those we have used and targeting the same regions has been already described (Nulf and Corey, 2004). Our demonstration of short PNA activity opens new perspectives and further demonstrates the potency of such molecules. Numerous ways of coupling PNA with cell-penetrating peptides have been proposed but lead to molecules with a very high molecular weight (Rasmussen et al., 2006). The use of short PNAs, with the limitations listed above, can help in the creation of smaller molecules with enhanced abilities to enter the cell. Furthermore, as we have demonstrated elsewhere

(Caldarelli et al., 2005), small PNAs permit cyclization of the molecules, thus mimicking highly stable loop-loop complexes. Such modifications, although they still needed to be optimized, could lead to highly selective molecules as described for RNA aptamers by Toulme and co-workers (Aldaz-Carroll et al., 2002). It is possible that PNA molecules directed against the HCV IRES shorter than 17-mers can be used without interfering with cellular sequences since what they are targeting is not just a short sequence but a short sequence that occupies an important position in a far larger complex structure.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Sandrine Bourg and Christine Lamadon for technical assistance and Dr. Alan Kay for helpful suggestions. This work was supported by a grant of the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS). This work was supported in part by a grant of the European Community and is part of the activities of the VIRGIL European Network of Excellence (contract LSHM-CT-2004-503359).

REFERENCES

- Aldaz-Carroll, L., Tallet, B., Dausse, E., Yurchenko, L., and Toulme, J. J. (2002). Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through in vitro selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. *Biochemistry* 41(18), 5883-93.
- Alt, M., Eisenhardt, S., Serwe, M., Renz, R., Engels, J. W., and Caselmann, W. H. (1999). Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *European Journal of Clinical Investigation* 29(10), 868-876.
- Blight, K. J., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2002). Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Virol.* 76(24), 13001-13014.
- Branch, A. D. (1998). A good antisense molecule is hard to find. *Trends Biochem Sci* 23(2), 45-50.
- Brown-Driver, V., Eto, T., Lesnik, E., Anderson, K. P., and Hanecak, R. C. (1999). Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2[prime]-modified antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9, 145-154.
- Caldarelli, S. A., Mehiri, M., Di Giorgio, A., Martin, A., Hantz, O., Zoulim, F., Terreux, R., Condom, R., and Patino, N. (2005). A cyclic PNA-based compound targeting domain IV of HCV IRES RNA inhibits in vitro IRES-dependent translation. *Bioorg Med Chem* 13(20), 5700-9.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244(4902), 359-62.
- Christensen, L., Fitzpatrick, R., Gildea, B., Petersen, K. H., Hansen, H. F., Koch, T., Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., and Coull, J. (1995). Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J Pept Sci* 1(3), 175-83.
- Crooke, S. T. (1993). Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties. *Faseb J* 7(6), 533-9.
- Crooke, S. T. (2004). Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 55, 61-95.
- De Francesco, R., and Migliaccio, G. (2005). Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436(7053), 953-60.
- Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S. H., and Nielsen, P. E. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol* 48(6), 1310-3.
- Doyle, D. F., Braasch, D. A., Simmons, C. G., Janowski, B. A., and Corey, D. R. (2001). Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry* 40(1), 53-64.

- Dutartre, H., Bussetta, C., Boretto, J., and Canard, B. (2006). General catalytic deficiency of hepatitis C virus RNA polymerase with an S282T mutation and mutually exclusive resistance towards 2'-modified nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 50(12), 4161-9.
- Fried, M. W., Shiffman, M. L., Reddy, K. R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves, F. L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J., and Yu, J. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347(13), 975-82.
- Hanecak, R., Brown-Driver, V., Fox, M. C., Azad, R. F., Furusako, S., Nozaki, C., Ford, C., Sasmor, H., and Anderson, K. P. (1996). Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol* 70(8), 5203-12.
- Honda, M., Beard, M. R., Ping, L. H., and Lemon, S. M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 73(2), 1165-74.
- Honda, M., Brown, E. A., and Lemon, S. M. (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna* 2(10), 955-68.
- Kronke, J., Kittler, R., Buchholz, F., Windisch, M. P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., and Frese, M. (2004). Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 78(7), 3436-46.
- Le Pogam, S., Kang, H., Harris, S. F., Leveque, V., Giannetti, A. M., Ali, S., Jiang, W. R., Rajyaguru, S., Tavares, G., Oshiro, C., Hendricks, T., Klumpp, K., Symons, J., Browner, M. F., Cammack, N., and Najera, I. (2006). Selection and characterization of replicon variants dually resistant to thumb- and palm-binding nonnucleoside polymerase inhibitors of the hepatitis C virus. *J Virol* 80(12), 6146-54.
- Lima, W. F., Brown-Driver, V., Fox, M., Hanecak, R., and Bruice, T. W. (1997). Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem* 272(1), 626-38.
- Lundin, K. E., Good, L., Stromberg, R., Graslund, A., Smith, C. I. E., and Jeffrey C. Hall, J. C. D. T. F. a. V. v. H. (2006). Biological Activity and Biotechnological Aspects of Peptide Nucleic Acid. In "Advances in Genetics", Vol. Volume 56, pp. 1-51. Academic Press.
- Manns, M. P. (2001). PEG-interferon-[alpha]2b plus ribavirin compared with interferon-[alpha]2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.
- Manns, M. P., Wedemeyer, H., and Cornberg, M. (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut* 55(9), 1350-9.
- McCaffrey, A. (2003). A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology* 38(2), 503-508.
- McHutchison, J. G., Patel, K., Pockros, P., Nyberg, L., Pianko, S., Yu, R. Z., Dorr, F. A., and Kwoh, T. J. (2006). A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 44(1), 88-96.
- Mizutani, T., Kato, N., Hirota, M., Sugiyama, K., Murakami, A., and Shimotohno, K. (1995). Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commun* 212(3), 906-11.
- Mo, H., Lu, L., Pilot-Matias, T., Pithawalla, R., Mondal, R., Masse, S., Dekhtyar, T., Ng, T., Koev, G., Stoll, V., Stewart, K. D., Pratt, J., Donner, P., Rockway, T., Maring, C., and Molla, A. (2005). Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 49(10), 4305-14.
- Nakabayashi, H. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Research* 42(9), 3858-3863.
- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254(5037), 1497-500.

- Nulf, C. J., and Corey, D. (2004). Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res* 32(13), 3792-8.
- Pawlotsky, J. M. (2006). Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology* 43(2 Suppl 1), S207-20.
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratzin, V., and Lai, C. L. (2003). Viral hepatitis C. *The Lancet* 362(9401), 2095-2100.
- Rasmussen, F. W., Bendifallah, N., Zachar, V., Shiraishi, T., Fink, T., Ebbesen, P., Nielsen, P. E., and Koppelhus, U. (2006). Evaluation of transfection protocols for unmodified and modified peptide nucleic acid (PNA) oligomers. *Oligonucleotides* 16(1), 43-57.
- Robaczewska, M., Narayan, R., Seignerres, B., Schorr, O., Thermet, A., Podhajaska, A. J., Trepo, C., Zoulim, F., Nielsen, P. E., and Cova, L. (2005). Sequence-specific inhibition of duck hepatitis B virus reverse transcription by peptide nucleic acids (PNA). *J Hepatol* 42(2), 180-7.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning : a laboratory manual." 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schwergold, C., Depecker, G., Giorgio, C. D., Patino, N., Jossinet, F., Ehresmann, B., Terreux, R., Cabrol-Bass, D., and Condom, R. (2002). Cyclic PNA hexamer-based compound: modelling, synthesis and inhibition of the HIV-1 RNA dimerization process. *Tetrahedron* 38, 5675-5687.
- Seeff, L. B. (2002). Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 36(5 Suppl 1), S35-46.
- Seki, M., and Honda, Y. (1995). Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: in vitro translation assay. *J. Biochem* 118(6), 1199-1204.
- Smith, D. B., Mellor, J., Jarvis, L. M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., Yap, P. L., and Simmonds, P. (1995). Variation of the hepatitis C virus 5'non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *Journal of General Virology* 76(7), 1749-1761.
- Soler, M., Pellerin, M., Malnou, C. E., Dhumeaux, D., Kean, K. M., and Pawlotsky, J. M. (2002). Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5'noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology* 298(1), 160-73.
- Tallet-Lopez, B., Aldaz-Carroll, L., Chabas, S., Dausse, E., Staedel, C., and Toulme, J. J. (2003). Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res* 31(2), 734-42.
- Thelu, M. A., Drouet, E., Hilleret, M. N., and Zarski, J. P. (2004). Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol* 72(3), 396-405.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* 66(3), 1476-83.
- Vidalin, O., Major, M. E., Rayner, B., Imbach, J. L., Trepo, C., and Inchauspe, G. (1996). In vitro inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(10), 2337-2344.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11(7), 791-6.
- Wakita, T., and Wands, J. R. (1994). Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *Journal of Biological Chemistry* 269(19), 14205-14210.
- Walewski, J. L., Keller, T. R., Stump, D. D., and Branch, A. D. (2001). Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA-A Pub. RNA Soc.* 7, 710-721.
- Zhang, H. (1999). Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV vaccinia virus recombinant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 347-353.

LEGENDS

Figure 1

(A) **HCV 5'UTR secondary structure and PNA target sites.** Major structural domains I to IV are indicated. The AUG start codon in the domain IV is highlighted. Target sites of the PNAs are indicated by straight or dashed lines. PNA 9 has the same sequence than PNA 8 with an addition of a Lysin amino acid in 3' end. Adapted from (Honda et al., 1999) (B) **Peptide Nucleic Acids and Phosphorothioates used in this study.** K represents Lysine amino acids added at the 3' end of some PNAs. * represents phosphorothioates linkages. (C) **Schematic representation of the bicistronic reporter cassette from plasmid pFL-hRL expressing both firefly and renilla luciferase.** Transcription is initiated under the control of a composite CMV-T7 promoter. The upstream cistron encodes Firefly luciferase and is translated by a cap-dependent mechanism in transfected cells, while a downstream cistron encoding humanized Renilla luciferase is translated under the control of the HCV IRES. The HCV sequence within the intercistronic space represents the region from nucleotide 19 to 341 of the HCV genome of a genotype 1b virus fused in frame to Firefly luciferase.

Table 1

Analysis of IRES from HCV infected patients. Patients are named according to their response to ribavirine and interferon therapy: SR is for sustained responders and NR for non responders. HCV genotype are indicated for each patients. * Bicistronic plasmids corresponding to the indicated patients were used to perform in vitro coupled transcription-translation in TnT Rabbit Reticulocyte Lysate system or after transfection in HuH7 cells. Relative IRES directed translation efficiency was assessed by measuring the ratio of hRluc to Fluc by using the dual luciferase kit assay. Results shown are percentage of ratio for a construct compared with ratio obtained with a construct with an H77 IRES. ** Sequencing was performed and compared with the reference strain (HCV-H77 for genotype 1a and HCV-J for genotype 1b). The number of mutations in IRES sequences, from nt 19 to nt 356 (338 nt), is indicated. *** Mutations observed and numbered according to the reference strains. C204U and C204A are located in unpaired regions. U78C and G107A results in improvement in base pairing.

Figure 2

In vitro inhibition of HCV IRES dependent translation by PNA. Bicistronic plasmid with IRES sequence of patient NR2 was used to perform in vitro coupled transcription-translation in TNT Rabbit Reticulocyte Lysate system. Relative IRES directed translation efficiency was assessed by measuring the ratio of hRluc to Fluc, using the dual luciferase kit assay in presence of the different PNA (A). The effect on the inhibitory activity of one mismatch nucleotide on PNA 8 (B) and 10 (C) was tested.

Figure 3

Comparison of in vitro inhibition of HCV IRES dependent translation by phosphorothioates and PNA 10. Bicistronic plasmid with IRES sequence of patient NR2 were used to perform in vitro coupled transcription-translation in TNT Rabbit Reticulocyte Lysate system. Relative IRES directed translation efficiency was assessed by measuring the ratio of hRluc to Fluc using the dual luciferase kit assay.

Figure 4

Inhibition in establishment of luc-JFH1 replication in Huh-7.5 cells after electroporation of RNA transcripts with PNA-10. HCV IRES directed luciferase synthesis was assessed after electroporation of Huh-7.5 cells with luc-JFH1 construct RNA in presence of a range of 0, 6.5, 13, 20 and 26nM of PNA-10 (black bar) or PNA-10 scramble (white bar). 48h hours after incubation, cell lysates were subjected to a luciferase assay. The data shown are averages of two independent assays \pm standard deviations.

FIGURES & TABLES

Figure 1

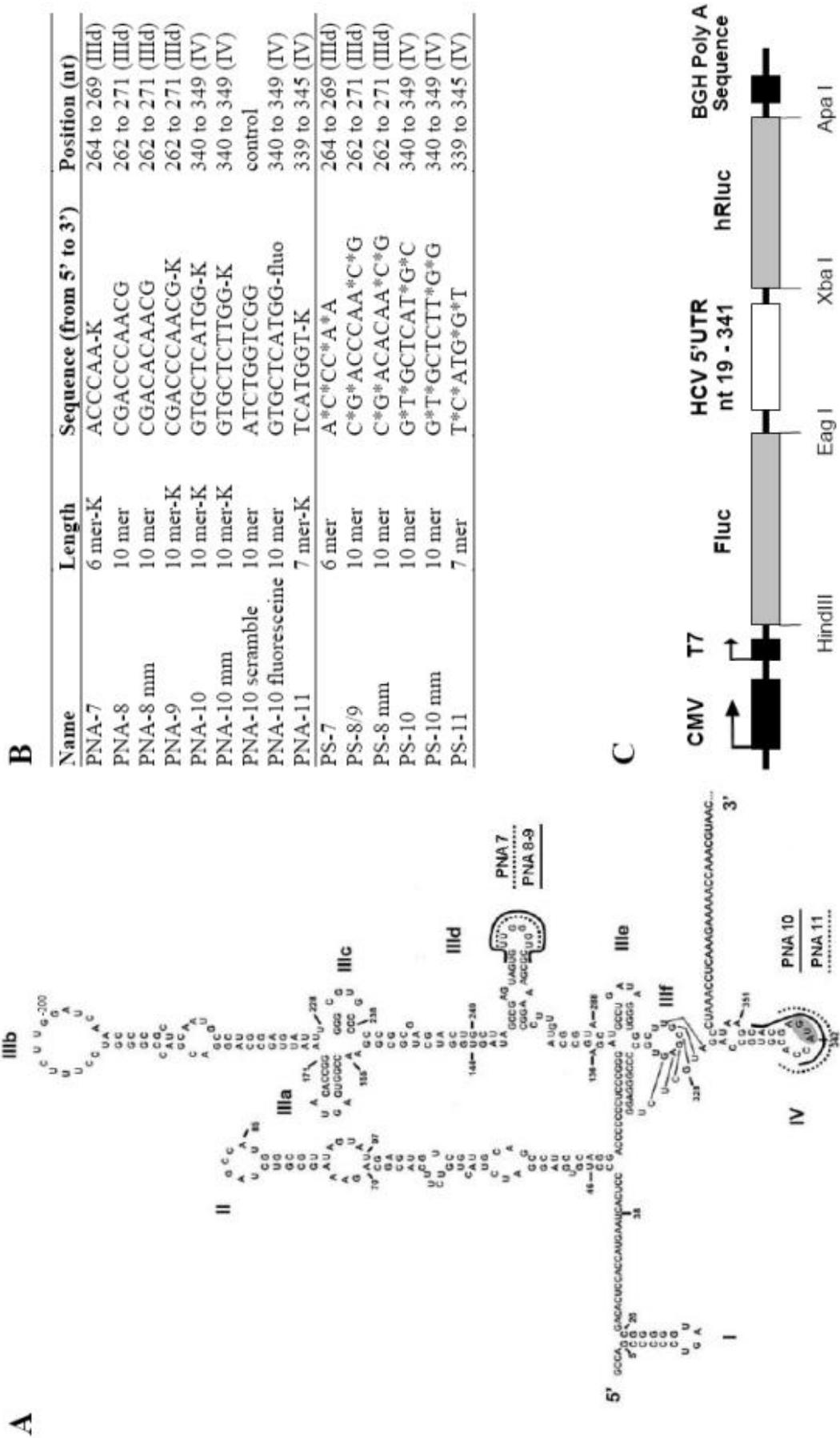
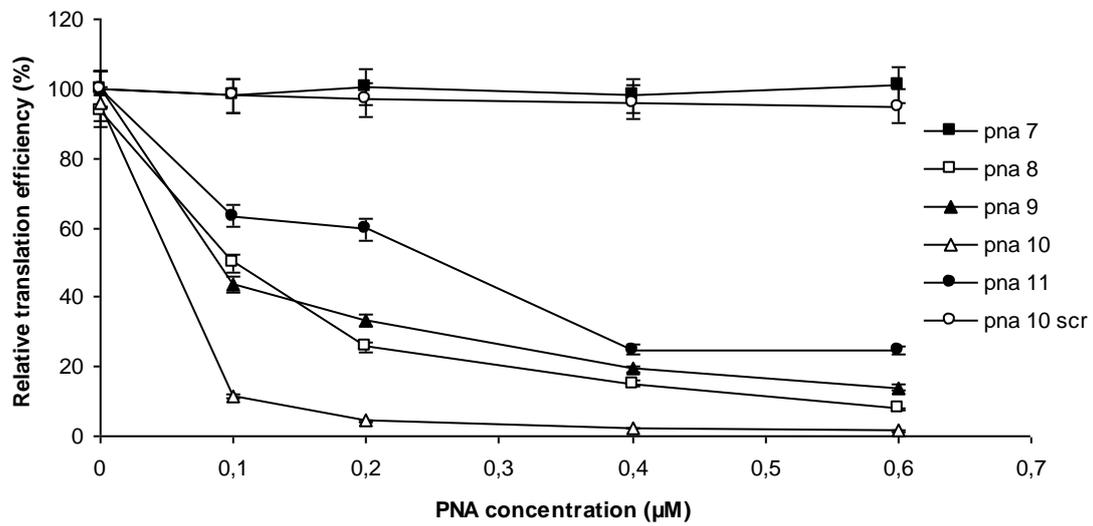


Table 1

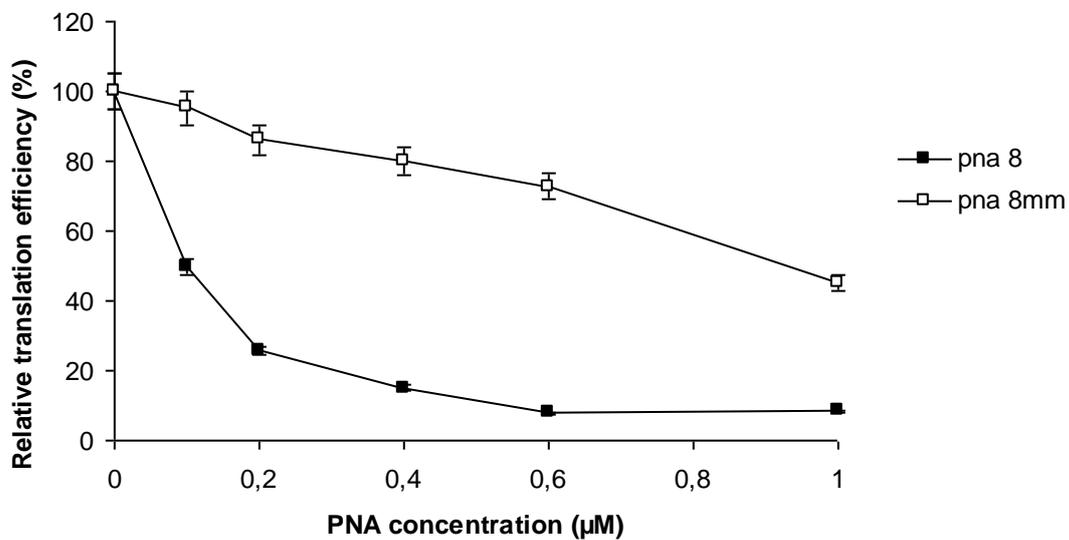
Patient	Genotype	IRES activity in RRL *	IRES activity in HuH7 cells *	Mutations in IRES sequences **	Mutations ***
SR1	1a	102 %	92 %	2/338	U78C C204A
SR2	1b	94 %	107 %	0/338	
SR3	1b	77 %	95 %	1/338	C204U
NR1	1b	70 %	107 %	0/338	
NR2	1a	81 %	72 %	0/338	
NR3	1a	62 %	99 %	1/338	G107A

Figure 2

A



B



C

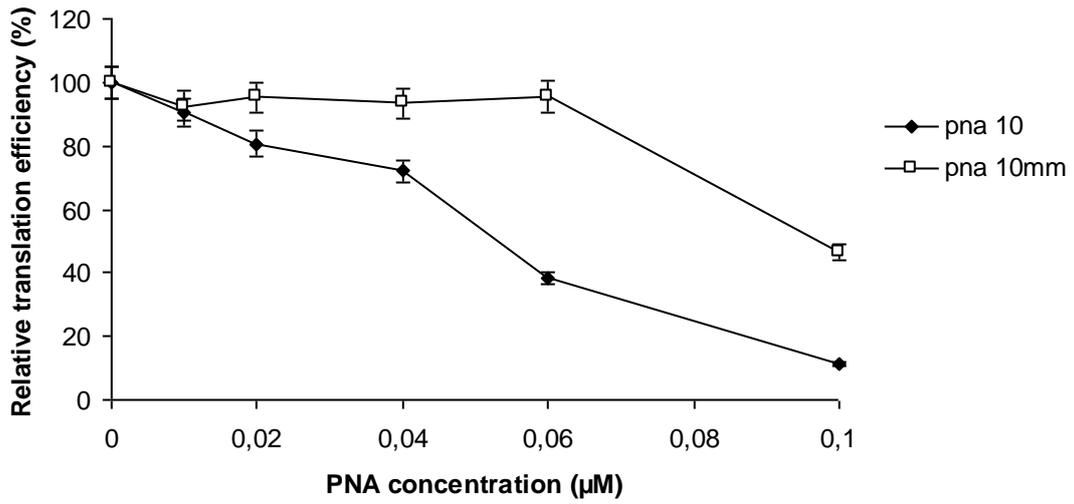


Figure 3

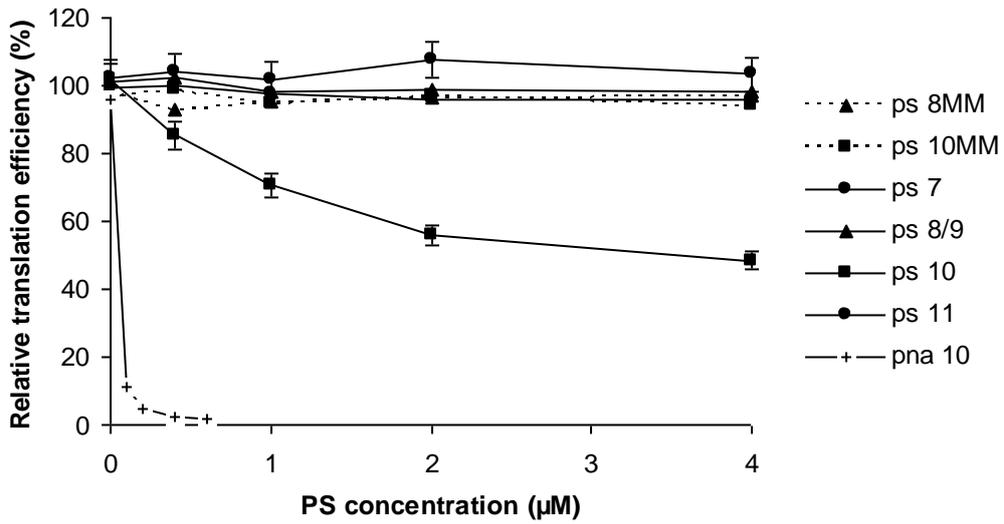
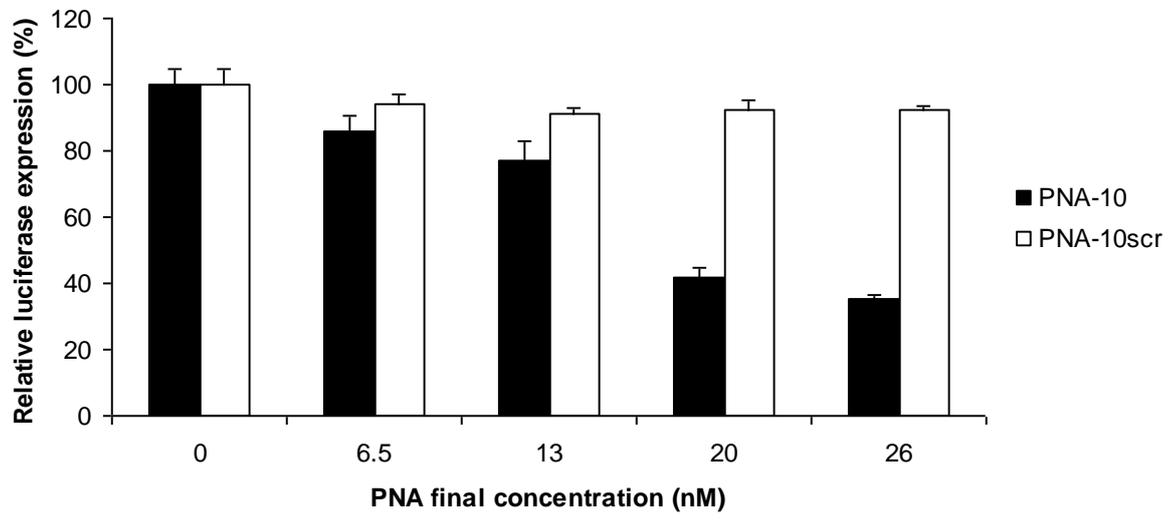


Figure 4



B - INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Au niveau mondial, 170 millions de personnes sont infectées par le virus de l'hépatite C (VHC) et dans plus de 70% des cas, le virus est à l'origine d'une infection persistante qui conduit au développement de maladies du foie, de cirrhoses et du carcinome hépatocellulaire (Poynard *et al.*, 2003; Seeff, 2002). Les traitements basés sur l'association d'interféron alpha-2a ou -2b et de la ribavirine sont efficaces dans 50 à 60 % des cas en moyenne (Fried *et al.*, 2002; Manns, 2001). Ils sont cependant assez mal tolérés du fait d'effets secondaires importants, (Manns *et al.*, 2006). De nouvelles thérapies sont en cours de développement dans l'objectif d'améliorer les traitements actuels (Pawlotsky, 2006).

Le VHC est un virus membre de la famille des *Flaviridae*, à ARN simple brin et de polarité positive (Choo *et al.*, 1989). Le génome viral est d'environ 9600 nucléotides. Il code une polyprotéine de 3000 nucléotides environ et une protéine F issue d'un cadre de lecture alternatif qui chevauche le gène codant la protéine de capsid (Walewski *et al.*, 2001). L'initiation de la traduction est basée sur un mécanisme cap-indépendant qui utilise un site interne d'entrée du ribosome (IRES) localisé dans la région 5'UTR de l'ARN viral (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992). En dépit de la grande variabilité génétique du VHC (Smith *et al.*, 1995), il a été montré que la séquence IRES est hautement conservée. Il est possible de définir une structure secondaire unique de l'ARN formant la région IRES, contenant trois boucles (de II à IV) et un pseudo-nœud (Honda *et al.*, 1999; Honda *et al.*, 1996); la conservation de cette structure est indispensable au maintien de son activité (Thelu *et al.*, 2004). **La région IRES représente alors une cible intéressante pour une approche thérapeutique basée sur des antisens.**

→ VOIR FIGURE 1A DE L'ARTICLE.

De nombreux groupes ont déjà testés des oligonucléotides antisens capables d'inhiber à la fois *in vitro* et dans des modèles murins la synthèse de la polyprotéine virale (Alt *et al.*, 1999a; Brown-Driver *et al.*, 1999; Hanecak *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1997; Mizutani *et al.*, 1995; Seki et Honda, 1995a; Vidalin *et al.*, 1996a; Wakita et Wands, 1994b; Zhang, 1999). Un essai clinique de phase 1/2 basé sur l'utilisation d'oligonucléotides phosphorothioates (PS-ODN) a été initié (ISIS 14803) avant d'être arrêté à la fois pour des raisons de sécurité et de manque d'efficacité (McHutchison *et al.*, 2006). Plus généralement, les **oligonucléotides antisens utilisés jusqu'à récemment étaient des antisens de première génération** qui étaient sensibles aux dégradations par les nucléases, présentaient des profils d'affinité faibles vis-à-vis de leur cible et étaient accompagnés d'effets secondaires lorsque utilisés *in vivo* (Crooke, 2004).

Des oligonucléotides antisens de deuxième génération pourraient améliorer l'efficacité de telles approches. Ils présentent des modifications à la fois sur le sucre et sur le squelette de la molécule. Des études ont montré qu'ils pouvaient avoir une activité inhibitrice *in vitro* contre le VHC (McCaffrey, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003). Le développement de nouveaux agents thérapeutiques pour contrôler l'infection par le VHC reste néanmoins nécessaire. L'utilisation de Peptide Nucleic Acids (PNA), une autre classe d'antisens pourrait permettre de réaliser des avancées. Ce sont des analogues d'acides nucléiques qui contiennent des bases nucléiques naturelles portées par un squelette modifié (Nielsen *et al.*, 1991). Ils ont la capacité de se fixer de manière très efficace sur des séquences d'ARN et d'ADN et d'inhiber très efficacement la traduction des ARNm en se liant aux sites internes d'entrée de la petite sous-unité ribosomale 40S (Doyle *et al.*, 2001).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Nous avons testé l'hypothèse que de courts PNA de 7 à 10 nucléotides de longueur ciblant la région en boucle III_d et IV de l'IRES du VHC pouvaient inhiber *in vitro* la traduction IRES dépendante du VHC. Nous avons également cherché à déterminer si ces molécules étaient sensibles à un mésappariement et les avons comparées avec des analogues phosphorothioates. Enfin, nous avons essayé de montrer que ces molécules pouvaient inhiber l'établissement d'un cycle de réplication complet d'un génome VHC luc-JFH1 en cellules Huh-7.5.

C - RESULTATS

Comparaison des efficacités de traduction *in vitro* et en culture de cellules des régions 5'UTR.

Pour analyser l'activité de l'IRES *in vitro* et après transfection de cellules Huh-7, nous avons construit un nouveau plasmide bicistronique permettant des clonages facilités et la mesure de l'activité biologique de l'IRES d'isolats du VHC obtenus chez des patients infectés. Le plasmide pFI-hRI est un plasmide bicistronique contrôlé par un promoteur CMV/T7. A la place d'une séquence codant la luciférase Renilla, nous avons préféré utiliser une séquence codant la luciférase Renilla humanisé pour son activité transcriptionnelle théoriquement améliorée (données du fabricant). La construction comporte les séquences de la région 5'UTR allant du nt 19 au nt 356 (nucléotide 15 de la protéine de capsid).

→ VOIR FIGURE 1C DE L'ARTICLE.

Nous avons montré en système couplé en lysat de réticulocytes de lapin que le plasmide pFI-hRI avec l'IRES d'une séquence de référence 1a (HCV-H77) permettait d'avoir 40% de traduction relative alors qu'une construction basée sur une luciférase Renilla non modifiée n'autorisait que 10% de traduction relative (Figure 86 - **Données non publiées**)

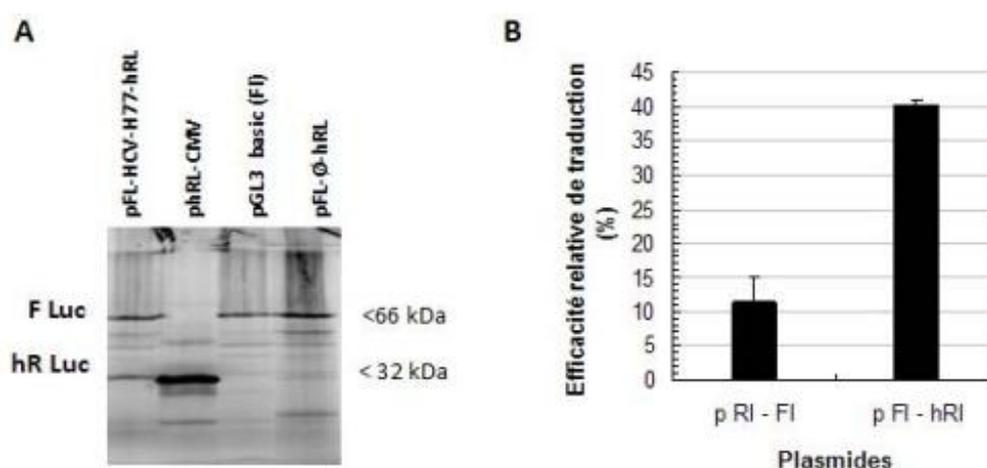


Figure 86 : (A) SDS-PAGE après traduction en lysat de réticulocytes et marquage des protéines à la Met [³⁵S] (B) Comparaison des efficacités relatives de traduction en RRL (Données non publiées)

La région IRES des patients sélectionnés pour cette étude (trois patients répondeurs à la bithérapie et trois non répondeurs, tous infectés par un génotype 1) ont été isolés et clonés dans le plasmide bicistronique pFI-hRI (pour les détails du clonage, se rapporter à la partie Matériels et Méthodes de l'article). Toutes les constructions ont été séquencées. Très peu de différences ont été observées entre les séquences. Une fois positionnées sur la structure secondaire de l'IRES, deux se trouvent dans des régions non appariées (C204A et C204U). L'importance du maintien de la structure secondaire est mise en évidence par deux autres substitutions qui améliorent l'appariement (U78C et G107A). Aucune différence n'a été trouvée dans les régions III d ou IV.

L'activité IRES des différents isolats a été analysé à la fois *in vitro* en Lysat de réticulocytes de lapin et après transfection dans des cellules Huh-7. Dans tous les cas, les mutations observées n'ont pas d'impact sur l'activité de traduction de l'IRES.

Ces résultats confirment que l'IRES du VHC est une région hautement conservée à un niveau nucléotidique et ne présente pas de variations d'activités entre les individus.

→ VOIR TABLEAU 1 DE L'ARTICLE.

Inhibition *in vitro* de la traduction IRES dépendante par des *Peptide Nucleic Acids*

Les capacités des PNA à inhiber la traduction de l'ARN du VHC ont été évaluées *in vitro* dans un système TnT de transcription/traduction couplée. Nous avons utilisé le plasmide pFI-hRI NR1 réalisé à partir d'un IRES cloné chez un patient de génotype 1b non répondeur au traitement antiviral et dont la séquence correspondait à un génotype 1b (souche de référence HCV-J). Les inhibitions non spécifiques ont été évaluées avec la même construction en mesurant la traduction IRES indépendante de la luciférase Firefly.

→ VOIR FIGURE 2A DE L'ARTICLE.

Parmi les cinq PNA étudiés, quatre présentent un effet inhibiteur de manière dose dépendante. Seul le PNA-7 n'est pas inhibiteur aux concentrations testées. Les PNA 8, 9 et 11 ont un effet inhibiteur avec des IC_{50} calculées respectivement à 100nM, 100nM et 250nM. Le PNA-10 est le plus efficace avec une IC_{50} calculée à 54nM. Les concentrations dépassant 1 μ M sont à l'origine d'effets non spécifiques observés sur l'expression de la luciférase Firefly. Un PNA *mélangé* (*scramble*) a également été testé et ne présente pas d'activité. Comme les PNA peuvent se fixer aux ARN et à l'ADN, nous avons vérifié que les effets observés dans nos conditions expérimentales étaient bien liés à une fixation des PNA sur l'ARN. Dans cet objectif, nous avons réalisé des expériences similaires à partir d'ARN transcrit *in vitro* et traduit en lysat de réticulocyte standard. Des résultats similaires ont été obtenus avec des IC_{50} très proches (données non présentées). Nous avons également réalisé des Northern Blot sur les lysats de réticulocytes après avoir réalisé une transcription/traduction couplée. Aucune modification de taille ou de quantité des transcrits n'a été observé (Figure 87 – **Données non publiées**)

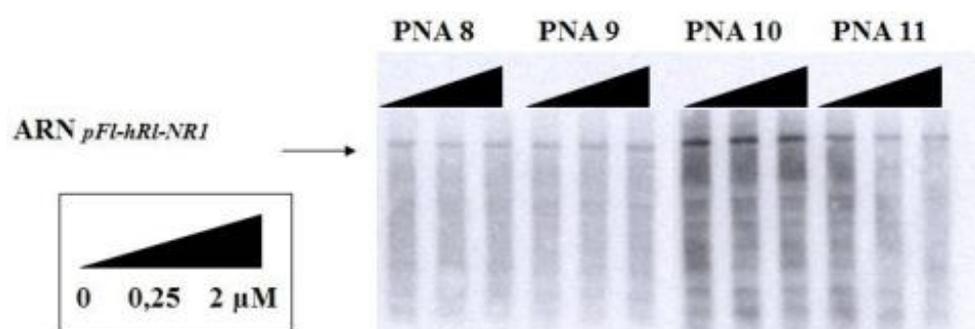


Figure 87 : Northern Blot contre l'ARN pFI-hRI-NR1 avec une sonde ADN dirigée contre hRenilla et marquée au dCTP α^{32} P.

L'influence de nucléotides créant des mésappariements a été analysée. Nous avons introduit un unique mésappariement dans la séquence du PNA-8 qui cible la région IIIId (triplet GGG) et dans la séquence du PNA-10 qui cible la région IV (codon AUG initiateur). Une réduction de 10 fois de l'efficacité du PNA-8 *mismatch* comparé au PNA-8 a été observée (augmentation de l' IC_{50} de 100nM vers 1 μ M). Dans le cas du PNA-10, un unique mésappariement conduit également à une baisse de l'activité inhibitrice (augmentation de l' IC_{50} de 54nm vers 100nM)

→VOIR FIGURE 2B ET 2C DE L'ARTICLE.

Enfin, nous avons comparé les PNA avec des PS-ODN de même séquence et de même longueur. Un seul PS-ODN qui correspond au PNA-10, le plus efficace, a un effet inhibiteur avec une IC_{50} de $4\mu M$, ce qui représente une augmentation de 70 fois de l' IC_{50} . Les autres PS-ODN n'ont pas d'effets, ce qui est en accord avec d'autres études qui ont montré que des PS-ODN doivent avoir une longueur de 20nt et être utilisés à des concentrations plus importantes pour être efficaces.

→VOIR FIGURE 3 DE L'ARTICLE.

Inhibition de la traduction IRES dépendante en cultures de cellules.

Nous avons ensuite cherché à étudier si ces PNA courts pouvaient avoir un effet dans un modèle cellulaire. Le PNA-10 a été transfecté dans des cellules Huh-7 exprimant de manière transitoire les luciférases Firefly et hRenilla après transfection du plasmide pFI-hRI-NR1. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'activité luciférase. Aucune inhibition n'a été observée (Données non présentées). Nous avons réitérés nos essais avec un PNA-10 couplé à la fluoroescéine. Il apparaît que ni la transfection avec des lipides cationiques, ni l'électroporation des PNA, seuls ou avec le plasmide bicistronique de permet la pénétration du PNA dans des cellules en culture (Données non présentées). Nous avons alors réalisé une électroporation des PNA avec l'ARN transcrit *in vitro* d'une construction de génome entier du VHC (Wakita *et al.*, 2005). Dans ce dernier cas, le PNA-10 inhibe de manière dose-dépendante l'établissement du cycle de réplication complet de luc-JFH1. A 25nM, 65% des cellules ne répliquent par luc-JFH1. En comparaison, un PNA-10 *mélangé* n'a pas d'effet sur l'établissement d'un cycle de réplication complet.

→VOIR FIGURE 4 DE L'ARTICLE.

Ces résultats suggèrent que les PNA testés ne sont pas capables d'entrer dans des cellules s'ils ne sont pas associés avec un ARN simple brin contenant une séquence complémentaire.

D - DISCUSSION

A Lors que l'utilisation clinique de nouvelles molécules anti-VHC en phases de développement avancées se précise, la mise au point d'approches originales et complémentaires est nécessaire pour le futur, notamment pour lutter et prévenir l'émergence de mutants résistants aux traitements. En effet, les nouveaux agents anti-VHC qui ciblent la polymérase virale ou les protéases (De Francesco et Migliaccio, 2005) favorisent l'émergence rapide de mutants résistants, à la fois *in vitro* et dans un système réplicon mais également dans les premiers essais cliniques de phase I/II (Dutartre *et al.*, 2006; Le Pogam *et al.*, 2006; Mo *et al.*, 2005). Dans ce contexte, la région IRES du VHC représente une cible intéressante de part sa séquence qui est conservée parmi tous les génotypes et qui mute très peu.

Dans cette étude, nous avons analysé les séquences et les activités traductionnelles de plusieurs IRES isolés à partir d'isolats cliniques. Peu de variabilité au niveau de la séquence et au niveau des activités a été observée. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré que la variabilité de séquence de l'IRES ne semble par corrélérer avec des différences de niveaux de réplication du VHC *in vitro* et en cultures cellulaires (Thelu *et al.*, 2004) et ne dépend pas du statut répondeur/non-répondeur du patient (Soler *et al.*, 2002). Le potentiel d'une stratégie antisens dirigée contre l'IRES du VHC est ainsi confirmé comme une approche alternative pour le traitement de patients non – répondeurs à la thérapie par interféron ou aux futures combinaisons qui incluent les inhibiteurs de polymérase et de protéase.

L'inhibition de la région IRES du VHC a déjà été décrite *in vitro* avec une large gamme de molécules, incluant notamment des ribozymes, des siRNA et des oligonucléotides (Alt *et al.*, 1999a; Brown-Driver *et al.*, 1999; Hanecak *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1997; Mizutani *et al.*, 1995; Seki et Honda, 1995a; Vidalin *et al.*, 1996a; Wakita et Wands, 1994b; Zhang, 1999). La capacité de ces molécules à inhiber la réplication du VHC en culture de cellules ou *in vivo* a également été démontrée, avec toutefois des résultats et une sélectivité médiocres (Crooke, 2004; McHutchison *et al.*, 2006). Des oligonucléotides antisens de deuxième génération pourraient améliorer l'efficacité d'une telle approche. Certains ont déjà permis *in vitro* d'inhiber le VHC (McCaffrey, 2003; Tallet-Lopez *et al.*, 2003). Le développement d'agents thérapeutiques permettant de contrôler l'infection causée par le VHC reste toutefois nécessaire. Une autre classe d'antisens très prometteuse, les Peptide Nucleic Acids (PNA), pourrait permettre ce développement. Ils présentent une sélectivité accrue à l'ADN ou l'ARN et diminuée envers les protéines en comparaison avec les oligonucléotides phosphorothioates (PS-ODN). Les PNA sont également très résistants à la dégradation par les peptidase ou par les nucléases (Demidov *et al.*, 1994). Les PNA ont été utilisés comme molécules antisens contre plusieurs virus comme le VIH (Schwergold *et al.*, 2002) ou le VHB (Robaczewska *et al.*, 2005). Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que de courts PNA (6-10 mers) peuvent inhiber la traduction et la réplication du VHC en se liant aux boucles IIIId et IV de l'IRES.

Parmi les 6 PNA synthétisés, cinq ont présenté une activité inhibitrice de la traduction IRES dépendante du VHC. Le PNA-10 est la meilleure molécule testée avec une IC₅₀ de 54nM en lysat de réticulocytes de lapin (RRL). Cette inhibition est très spécifique ; des PNA avec seulement un mésappariement perdent leur activité inhibitrice. Aucune inhibition de la luciférase Firefly n'est observée aux concentrations inhibant l'activité de la luciférase Renilla. Dans notre construction, la protéine Firefly est traduite de manière cap-dépendante et non IRES dépendante et sa diminution serait associée à un effet indésirable. Notre étude montre que des analogues phosphorothioates (PS-ODN) de même longueur et même séquence sont en général inefficaces. Seul le PS-ODN correspondant au PNA le plus actif a une activité inhibitrice avec une IC₅₀ de 4µM, soit 70 fois supérieure comparé à l'IC₅₀ obtenue avec le PNA-10. Les résultats obtenus en électroporant la PNA-10 avec l'ARN d'une construction luc-JFH1 dans des cellules Huh-7.5 montrent une inhibition de l'établissement du cycle de réplication du VHC, d'une manière dose dépendante et spécifique vu qu'un PNA *mélangé* est inefficace. Ces résultats démontrent au final l'efficacité de courts PNA dirigés contre l'IRES du VHC dans un système *in vitro* et en culture de cellules.

Malheureusement, nous n'avons pas pu montrer un tel effet en électroporant les PNA seuls dans des cellules qui répliquaient déjà le virus JFH1. Des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle du réplicon luciférase. Nous ne pouvons donc pas exclure que le PNA-10 entre dans la cellule et présente une activité inhibitrice après électroporation avec sa cible ARN du fait que ce dernier agit comme un « transporteur ». Le PNA-10 *mélangé* serait alors incapable de se fixer sur l'ARN et de rentrer dans la cellule. L'absence de charge qui entraîne une faible pénétration cellulaire en l'absence de système de pénétration approprié est un défaut majeur des PNA, comme confirmé dans cette étude. Beaucoup de systèmes ont été développés pour améliorer cette pénétration mais aucun ne semble utilisable dans l'immédiat (Rasmussen *et al.*, 2006).

La longueur des PNA semble critique ; en effet, tous les composés d'une taille inférieure à 10mer sont moins efficaces. Il a également été calculé que des composés de moins de 17nt peuvent statistiquement se fixer sur plusieurs cibles dans les gènes cellulaires (Branch, 1998). En pratique, l'utilisation de longs PS-ODN était nécessaire du fait de la température d'hybridation du duplex (T_m) qui était plus faible comparé à des doubles brins d'ADN naturels et qui devaient alors mesurer 17 à 20nt pour se lier de manière efficace à la cible ARN (Crooke, 1993). Avec les PNA, de telles limitations disparaissent car ils se lient plus efficacement aux cibles ARN (Lundin *et al.*, 2006). Une inhibition efficace de la traduction dépendante de l'IRES du VHC avec de longs PNA (16-23 mer) ciblant les mêmes régions a déjà été décrite (Nulf and Corey, 2004). Notre démonstration de l'activité de courts PNA ouvre de nouvelles perspectives et démontre à nouveau le potentiel de ces molécules. De nombreux couplages avec des peptides qui augmentent la pénétration en cellules ont été proposés mais conduisent à des molécules avec un poids moléculaire élevé (Rasmussen *et al.*, 2006). L'utilisation de courts PNA, avec les limitations mentionnées précédemment, pourrait aider à mettre au point de nouvelles molécules avec de meilleures capacités à entrer dans la cellule. En particulier, de courts PNA peuvent être cyclisés (Caldarelli *et al.*, 2005), permettant alors de mimer des interactions boucle-boucle très stables (voir étude 3). De telles modifications, même si elles doivent être encore optimisées, pourraient permettre la mise au point de molécules hautement sélectives comme décrit avec les aptamères ARN par Toulmé *et col.* (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002). Il est enfin possible que des PNA dirigés contre l'IRES du VHC plus courts que 17 mers pourront être utilisés sans interférer avec les séquences cellulaires car leur cible, même très courte, semble accessible comme l'indique nos résultats .

E - CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer que de courts PNA pouvaient inhiber de manière dose dépendante la traduction IRES dépendante du VHC. Nous avons identifié un composé, le PNA-10 qui a une très bonne activité inhibitrice avec une IC50 de l'ordre de 54nM *in vitro*. L'intérêt de l'utilisation de PNA, des antisens de seconde génération est confirmé. En effet, nos résultats montrent que des analogues phosphorothioates de même taille et séquence sont incapables d'inhiber la traduction IRES dépendante. De plus, il apparait que les PNA ont un excellent pouvoir discriminant ; l'introduction d'un seul mésappariement entraîne une baisse importante de l'efficacité des composés.

La limitation à leur usage que nous avons mis en évidence est liée aux problèmes de pénétration en cultures de cellules. Nous avons réussi à obtenir une inhibition d'un cycle complet de réplication uniquement en électroporant les PNA avec l'ARN, ce dernier servant alors de transporteur s'il permet au PNA de se fixer.

Un PNA cyclique ciblant le domaine IV de l'IRES du VHC inhibe *in vitro* la traduction IRES dépendante.

Sergio A. Caldarelli,^a Mohamed Mehiri,^a Audrey Di Giorgio,^a **Amaury Martin**,^b Olivier Hantz,^b Fabien Zoulim,^b Raphael Terreux,^c Roger Condom^a and Nadia Patino^{a*}

^aLaboratoire de Chimie Bioorganique UMR-CNRS 6001, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France

^bINSERM U271, Virus des hépatites et pathologies associées, 151, cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 3, France

^cLaboratoire LPCM2, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 av. Rockefeller, 69373 Lyon, France

A Cyclic PNA-based Compound Targeting Domain IV of HCV IRES RNA Inhibits *in vitro* IRES-Dependent Translation.

Publié en Octobre 2005 dans Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol. 13 p. 5700-5709



A cyclic PNA-based compound targeting domain IV of HCV IRES RNA inhibits in vitro IRES-dependent translation

Sergio A. Caldarelli,^a Mohamed Mehiri,^a Audrey Di Giorgio,^a Amaury Martin,^b Olivier Hantz,^b Fabien Zoulim,^b Raphael Terreux,^c Roger Condom^a and Nadia Patino^{a,*}

^aLaboratoire de Chimie Bioorganique UMR-CNRS 6001, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France

^bINSERM U271, Virus des hépatites et pathologies associées, 151, cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 3, France

^cLaboratoire LPCM2, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 av. Rockefeller, 69373 Lyon, France

Received 30 March 2005; revised 3 June 2005; accepted 3 June 2005

Available online 2 August 2005

Abstract—A cyclic molecule **1** constituted by a hepta-peptide nucleic acid sequence complementary to the apical loop of domain IV of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) RNA has been prepared via a ‘mixed’ liquid-phase strategy, which relies on easily available protected PNA and poly(2-aminoethylglycinamide) building blocks. This compound **1** has been elaborated to mimic ‘loop–loop’ interactions. For comparison, its linear analog has also been investigated. Although preliminary biological assays have revealed the ability of **1** to inhibit in vitro the HCV IRES-dependent translation in a dose-dependent manner, the linear analog has shown a slightly higher activity.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The internal ribosome entry site (IRES) located in the 5'-untranslated region (UTR) of the hepatitis C virus (HCV) genomic RNA mediates the cap-independent initiation of viral translation and seems to be involved in RNA replication. HCV IRES is a phylogenetically highly conserved RNA sequence¹ which adopts an ion-dependent tertiary fold including four major conserved secondary structure subdomains.² These overall secondary and tertiary structures were shown to be crucial for specific recognition and binding of several cellular components such as the eukaryotic initiation factor eIF3 and the ribosomal subunit 40S, to form

the ribosomal initiation complex that, consequently initiates translation.^{3,4} Thus, the subdomain sequences involved in such interactions represent targets of interest for inhibiting viral replication. In this context, the stem-loop of domain IV (Fig. 1) is particularly attractive as it contains in the apical loop the start codon AUG which pairs with the initiator tRNA during the translation initiation process.^{5,6}

Among various approaches used to inhibit IRES function, the antisense strategy using synthetic DNA or RNA analogs complementary to different IRES sequences has been widely studied and seems to be an attractive tool both to understand IRES mechanisms and to develop anti-HCV drugs.

Thus, natural oligonucleotides,^{7–11} as well as modified analogs such as phosphorothioates,^{7,8,12–18} alpha-ano-

Abbreviations: Alloc, allyloxycarbonyl; Boc, *tert*-butyloxycarbonyl; DIPEA, diisopropylethylamine; DMF, dimethylformamide; HATU, *O*-(7-aza-1-benzotriazolyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOAt, 1-hydroxy-7-azabenzotriazole; Mmt, monomethoxytrityl; PyBop, (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; TFA, trifluoroacetic acid; TFMSA, trifluoromethane sulfonic acid; THF, tetrahydrofuran.

Keywords: Cyclic PNA; HCV IRES; Domain IV; Loop–Loop interaction.

*Corresponding author. Tel.: +33 04 92 07 61 46; fax: +33 04 92 07 61 51; e-mail: patino@unice.fr

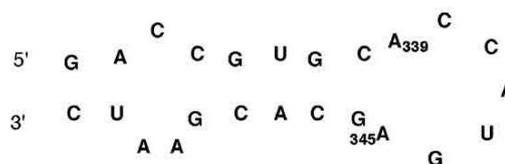


Figure 1. Structure of domain IV of HCV IRES RNA.

mer⁹ and 2'-methoxyethoxy phosphodiester^{14,18} methylphosphonates,⁷ benzylphosphonates,^{7,19} morpholin²⁰ (phenylalkyl)phosphonates,²¹ 2'-*O*-methyl,²² and recently peptide nucleic acids (PNAs),^{23,24} have been developed to target different IRES regions. These studies showed that linear natural and modified oligonucleotides (containing, in general, 15–25 residues) could bind to domain IV very strongly, thus inhibiting *in vitro* the initiation of IRES-dependent translation.

Another interesting approach to inhibit stem–loop (hairpin) structures is to mimic intermolecular loop–loop interactions that are widely present in RNA–RNA associations and serve a diverse range of biological functions. Due to the increased accessibility of the bases in hairpin loops, intermolecular loop–loop interactions are particularly well adapted to trigger molecular recognition and to induce RNA–RNA annealing. Several loop–loop complexes are well described in the literature,^{25–29} and one can cite as an example the interaction between two self-complementary dimerization initiation signal (DIS) loops responsible for the dimerization of the genomic HIV RNA.^{30–33}

We previously reported the liquid-phase synthesis as well as the biological activity of two cyclic PNA molecules^{34,35} and one of them was shown *in vitro* to interfere with the dimerization process of the HIV-1 genome. These 'loop-like' compounds, constituted by short PNA fragments (i.e., six residues), should afford several advantages over linear analogs, such as a greater selectivity, or over classical antisense oligomers, such as a lower molecular weight.

In this context, we designed compound **1**, which contains an antisense heptameric PNA moiety complementary to the seven residues of the domain IV loop and a spacer tethering the C- and N-terminal extremities of the PNA (Fig. 2). A molecular modeling study allowed us (i) to assess the length of the spacer in order to optimize the loop–loop interaction and (ii) to introduce a phenylalanine (F) residue at the PNA C-terminal extremity to increase stability of the complex via a π -stacking interaction between the phenyl moiety and the adjacent uracil nucleobase (Figs. 2 and 3).

In this paper, we report the molecular design and the liquid-phase synthesis of cyclic PNA [UCAUGGU]_{Fc}.

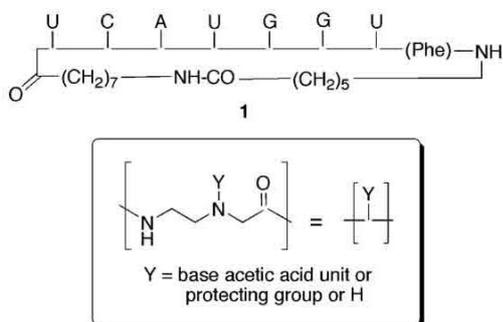


Figure 2. Structure of cyclic PNA [UCAUGGU]_{Fc} (**1**).

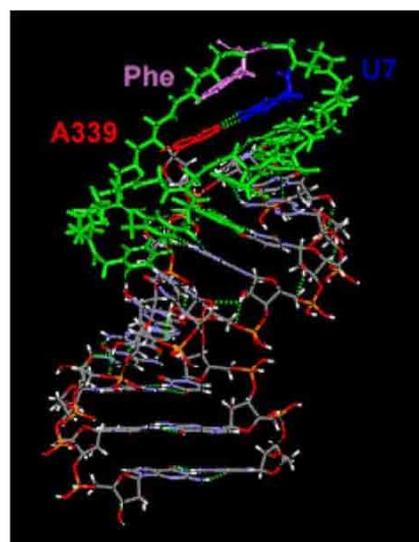


Figure 3. Molecular model of interaction between compound **1** and domain IV of HCV IRES RNA. Compound **1** is in green with its U7 residue in blue and its Phe residue in purple. A339 of domain IV is in red.

1, as well as the ability of **1** and of its linear PNA analog 5'-UCAUGGU-3' (synthesis not shown) to inhibit *in vitro* IRES-dependent translation.

2. Results and discussion

2.1. Molecular modeling studies

In the molecular model of interaction between compound **1** and domain IV of HCV IRES RNA, the RNA stem and the annealed section constituted by the RNA loop and the PNA fragment, form two stable double helices (Fig. 3). The axes of these helices are collinear as previously reported for the interaction between a cyclic PNA and the DIS RNA of HIV-1.³⁵ The residue A339 is not strictly aligned with the other RNA residues, but this break ensures the continuity of the RNA sequence without making a kink in the double helix structure. The seven nucleobases of the RNA loop form Watson–Crick interactions with the complementary nucleobases of the PNA fragment. The presence of a phenylalanine (F) residue on compound **1** allows to stabilize the last Watson–Crick base pair interaction (A339–U7).

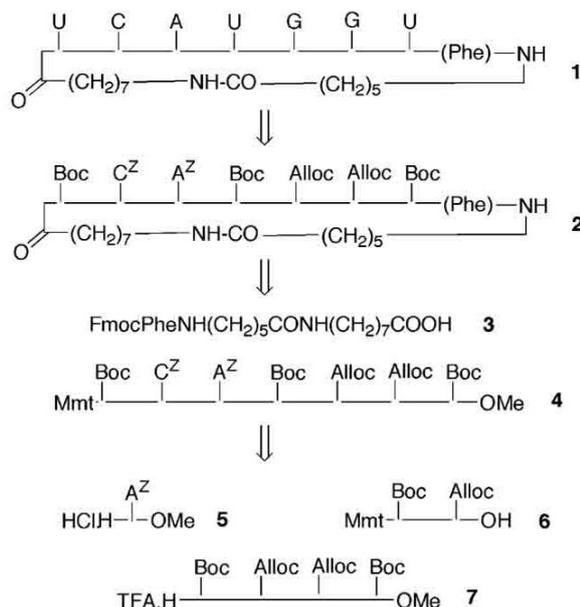
In the first step, a complex resulting from the interaction between the linear heptameric PNA bound with the phenylalanine residue and the domain IV RNA loop was built using Insight II molecular modeling package and the complex was energetically minimized with the CFF forcefield. In a second step, a linker of optimal length was added to close the structure. After an energetic minimization, the model was put under rectangular water box filled with TIP3P water molecules. The global charge was neutralized with Mg²⁺ counter ions. A 6 ns molecular dynamics simulation was computed at con-

stant pressure (1 bar) and at constant temperature (300 K). The simulation was performed on a SGI Origin 3800 supercomputer located at the 'Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur' (CINES) with the Amber 6 molecular modeling package. The shake algorithm was selected with 2 fs as integration time. During the first 800 ps, the temperature was linearly increased starting from 100 to 300 K. A conformation was sampled every 20 ps, and a close analysis of the trajectory revealed that all Watson–Crick interactions remained, and that the length of the linker was optimal. The phenylalanine residue protects the interaction between A339 and U7, since the angle between these two bases is comparable to the other base-pairs, angles in the RNA/PNA helix.

2.2. Chemistry

To synthesize compound **1**, we applied a 'mixed' strategy recently elaborated in our laboratory.³⁴ It relies on the protected PNA fragments and protected poly(2-aminoethylglycinamide) building blocks. This strategy has been shown to be a good alternative to the fully protected backbone (FPB) strategy^{35,36} when the PNAs to prepare contain four different nucleobases, because it allows to circumvent the difficulty to work with a combination of at least eight orthogonal protecting groups.

The retrosynthetic pathway to compound **1** is illustrated in Scheme 1. This compound results from the cyclic precursor **2**, a 'mixed' heptameric structure that contains two PNA units (C^Z and A^Z) and a protected penta(2-aminoethylglycinamide) unit. At the C- and N-terminal extremities, a spacer constituted by a 8-aminooctanoic acid, a 6-aminocaproic acid, and a phenylalanine (F), allows to close the molecule. The secondary amino functions of the penta(2-aminoethylglycinamide) moiety



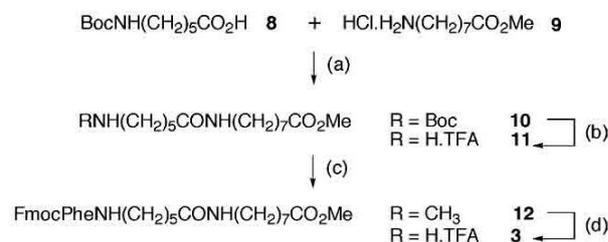
Scheme 1. Retrosynthetic route to compound **1**.

are protected by allyl and Boc protecting groups which are subsequently replaced, respectively with guanine and uracil acetic acid units in the last steps of the synthesis. Compound **2** is synthesized from spacer **3** and heptameric 'mixed' compound **4**, which is prepared from three key synthons previously described:³⁷ PNA fragment **5** and the protected di- and tetra-(2-aminoethylglycinamide) units (respectively, **6** and **7**).

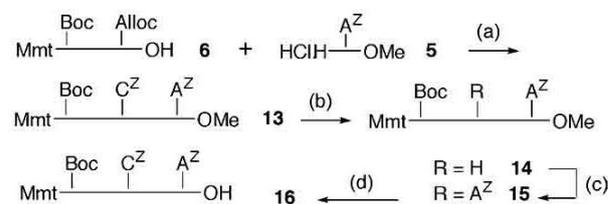
The synthesis of linker **3** is detailed in Scheme 2. It was prepared in four steps (70% overall yield) from commercially available *N*-Boc-aminocaproic acid **8**, methyl 8-aminooctanoate **9**, and *N*- α -Fmoc-L-phenylalanine.

The preparation of heptameric 'mixed' compound **4** (cf. Scheme 1) required the synthesis of 'mixed' compound **16** in four steps from compounds **5** and **6** (Scheme 3). In a first step, condensation of *N*-*Z*-adenine PNA monomer **5** with **6** by means of Bop reagent led to trimer **13** (80%). Then, a selective cleavage of the Alloc protecting group with Pd[PPh₃]₄/Et₂NH afforded **14**, onto which was condensed a *N*-*Z*-cytosine acetic acid unit via HATU/HOAt activation, to give **15** in 68% overall yield. Finally, acid **16** was obtained by saponification using 1 M LiOH.

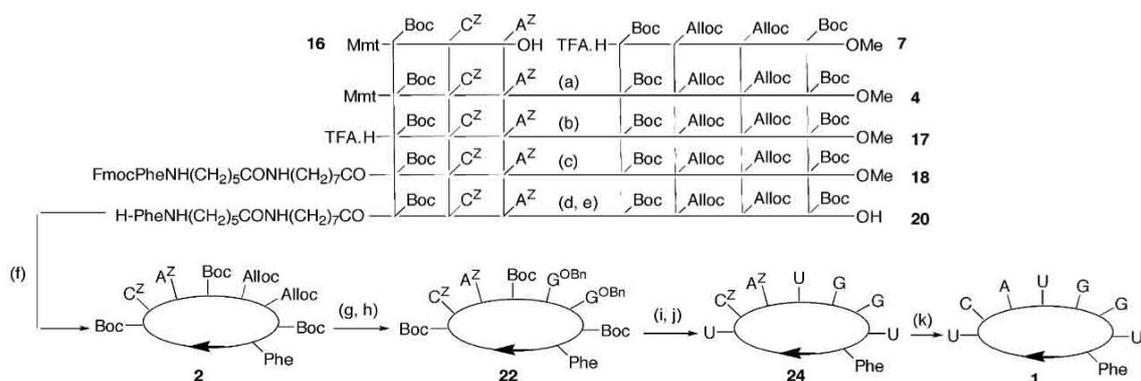
The condensation of **16** with protected tetramer **7** afforded 'mixed' heptameric compound **4** (Scheme 4). After cleavage of the Mmt protecting group by means of a solution of 2% TFA in CH₂Cl₂, the resulting compound **17** was coupled with spacer **3** to give compound **18**. The two condensation steps described above were performed via a PyBop activation, respectively, in 79% and 91% yields. The next steps were consisted removal of Fmoc from **18** with a Et₂NH/CH₂Cl₂ solution, to get **19**



Scheme 2. Synthesis of compound **3**. Reagents: (a) PyBop, NMM, DMF (89%); (b) TFA, CH₂Cl₂ (90%); (c) Fmoc-Phe-OH, Bop, DIPEA, DMF (86%); (d) Dioxane, HCl (12 N), (5:1, v/v), reflux (100%).



Scheme 3. Synthesis of compound **16**. Reagents: (a) Bop, DIPEA, DMF (80%); (b) Pd[PPh₃]₄, Et₂NH, CH₂Cl₂ (91%); (c) $C^ZCH_2CO_2H$, HATU, HOAt, DIPEA, DMF (75%); (d) 1 N LiOH, THF (99%).



Scheme 4. Synthesis of compound **1**. Reagents: (a) PyBop, DIPEA, DMF (79%); (b) TFA, CH₂Cl₂ (0.02:1, v/v) (88%); (c) Fmoc-PheNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CO₂H **3**, PyBop, DIPEA, DMF (91%); (d) Et₂NH, CH₂Cl₂ (97%); (e) 1 M LiOH, THF (93%); (f) HATU, HOAt, DIPEA, DMF (65%); (g) Pd[PPh₃]₄, Et₂NH, CH₂Cl₂ (95%); (h) G^{OBn}CH₂CO₂H, HATU, HOAt, DIPEA, DMF (95%); (i) TFA, CH₂Cl₂, TIS (93%); (j) UCH₂CO₂H, HATU, HOAt, DIPEA, DMF (88%); (k) TFMSA, TFA, thioanisole (100%).

(97%), which was saponified using a 1 M LiOH aqueous solution (93%) to afford **20**. At last, a head-to-tail cyclization of **20** via a HATU/HOAt activation and semi-high dilution conditions (10 mM) yielded cyclic ‘mixed’ precursor **2** in 65% yield.

The last stage for the synthesis of **1** consists in the introduction of the uracil and guanine acetic acid units to generate the heptameric PNA moiety (Scheme 4). To avoid unpredictable side reactions that uracil nucleobases are suspected to induce,³¹ we introduced first the guanine acetic acid units. Thus, a selective cleavage of the two Alloc protecting groups by means of Pd(PPh₃)₄/Et₂NH, afforded the coupling of two OBn-guanine acetic acid units onto the two free amino functions of **21**, via a HATU/HOAt activation, to give derivative **22** in 90% overall yield. Then, treatment of **22** with TFA/CH₂Cl₂/TIS led to the removal of the three Boc protecting groups as well as to the cleavage of the benzyl guanine exocyclic protecting groups. HATU-mediated condensation of three uracil acetic acid units onto **23** was then successfully achieved (88% yield) despite the presence of the free exocyclic amine functions onto the guanine residues. Finally, simultaneous Z removal of cytosine and adenine nucleobases of **24** by means of a TFMSA/TFA/thioanisole solution allowed to obtain compound **1** which was isolated after semi-preparative HPLC (16% yield). Its purity was determined by HPLC analyses and its structure was confirmed by MALDI-TOF experiments.

2.3. Inhibitory effect on HCV in vitro translation

To investigate the inhibitory action of compound **1** and of its linear counterpart (data not shown) on HCV IRES dependent translation, coupled transcription and translation experiments were performed (Fig. 4). Different concentrations of **1** were mixed with linearized plasmid pFl-HCV IRES-hRI leading, after transcription by T7 polymerase, to the expression of a single bicistronic transcript and, after translation, to the expression of luciferase proteins. The expression of firefly luciferase

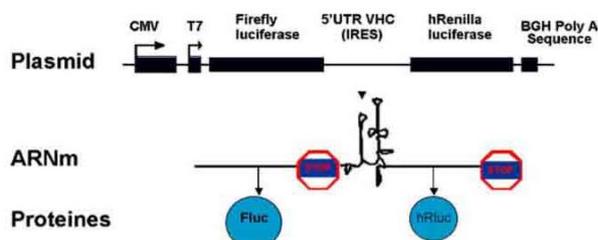


Figure 4. Model used for transcription and translation experiments.

is driven by a cap-dependent mechanism and should not be affected by the addition of **1**. In contrast, the expression of hRenilla luciferase is under the control of HCV IRES; its activity should be inhibited upon binding of **1** to IRES sequence(s), if the interaction is adequate to disrupt the association of proteins.

A dose-dependent inhibition of viral translation was observed (Fig. 5). Maximal effect was obtained with 30 μM

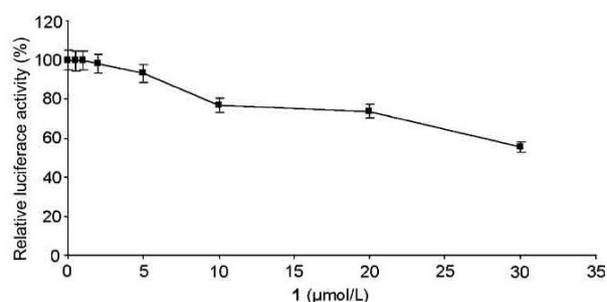


Figure 5. Inhibition assay of HCV-IRES dependent in vitro translation by **1**. Varying concentrations of **1** (μmol L⁻¹) were mixed with a rabbit reticulocyte lysate (Quick Master Mix) and 0.5 μg of linearized plasmid pFl-HCV IRES-hRI. Effect of **1** on the inhibition of IRES dependent translation of hRenilla luciferase was observed. hRenilla activity was normalized relative to firefly luciferase activity. Percentages are calculated relative to luciferase activity in the absence of **1**. All experiments were performed at least in triplicate. The percentage mean values ± SD are given on the curve.

of **1**, which corresponds to $45 \pm 5\%$ of IRES-mediated translation inhibition. Higher concentrations (up to $60 \mu\text{M}$) showed increasing inhibition of hRenilla luciferase and also a non-specific inhibition of firefly luciferase. Similar results were obtained when compound **1** was assayed directly with RNA transcripts on rabbit reticulocyte lysate (decoupling translation–transcription). The same experiments on the linear analog also revealed a dose-dependent inhibition of translation, of about $5 \mu\text{M}$ (data not shown).

The lower activity of cyclic PNA [UCAUGGU] F_c **1** compared with its linear analog could be explained in the light of the work reported by Toulmé and co-workers.^{29,38–40} Actually, they identified by in vitro selection the RNA aptamers directed against several RNA hairpins through loop–loop interactions. In all the cases, the loops of the aptamers showing the highest affinities are not strictly complementary to the targeted apical loops. Thus, the aptamers targeting domain IV of the HCV IRES contain in their loops a consensus sequence 5'-AUCAUGG-3' in which six residues (in bold) interact with six of the seven residues of the apical loop of domain IV.²⁹ This result seems to indicate that the structure of cyclic PNA **1** is not well adapted for a high-affinity interaction. The molecular modeling as well as the synthesis of a cyclic PNA containing the consensus sequence is currently under progress.

3. Conclusions

A cyclic PNA-based compound (**1**), containing the complementary heptameric sequence of the apical loop of domain IV of HCV IRES, has been designed in order to mimic highly stable loop–loop complexes. For comparison, its linear counterpart has also been investigated. The cyclic structure, of lower molecular weight than classical antisense oligomers, should be more selective than the linear analog.

Compound **1** has been successfully prepared via a 'mixed' liquid-phase strategy which relies on easily available protected PNA and poly(2-aminoethylglycinamide) building blocks. This procedure offers the advantage over the FPB strategy of requiring fewer orthogonal protecting groups, and enables the preparation of PNA containing the four nucleobases A, C, G, and U. Moreover, to avoid side-reactions due to the uracil moiety, this nucleobase must be introduced at the last stages of the synthesis.

Preliminary biological assays have revealed the ability of compound **1** and of its linear counterpart to interfere in vitro with the HCV IRES-dependent translation in a dose-dependent manner. This result suggests for the first time that a cyclic PNA targeting the HCV 5'-UTR is able to specifically downregulate HCV IRES-directed translation. The lower activity of the cyclic compound compared with its linear analog could be explained by the results obtained by Toulmé and co-workers. Further experiments are under progress to confirm the binding site as well as the mode of action

of these compounds, to evaluate their selectivity and to optimize the cyclic PNA structure.

4. Experimental (chemistry)

4.1. General

Analytical thin-layer chromatography was conducted on Merck precoated silica gel 60F₂₅₄ plates and the compounds were visualized with ninhydrin test and/or by visualization under ultraviolet light (254 nm). Chromatography was performed on Merck Silica gel 60 (230–400 mesh ASTM) using the solvent systems (volume ratios) indicated below. Analytical HPLC chromatograms were obtained using a Waters HPLC system (600E system controller, 996 photodiode array detector or 2487 dual wavelength absorbance detector) and a Merck Lichrospher 100 ($250 \times 4 \text{ mm}^2$) RP-18 ($5 \mu\text{m}$) column. The HPLC flow rate was 1 mL/min, and the elution solvents were water (0.1% TFA) as solvent A, and acetonitrile (0.1% TFA) as solvent B (pH 6). ¹H and ¹³C NMR spectroscopies were performed using a Bruker AC 200 or AC 500 Fourier Transform spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) (in ¹H NMR descriptions s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, and bs = broad peak). ESI mass spectra were recorded with an INCOS 500^E FINNIGAN MAT or a TSQ 7000 FINNIGAN MAT. MALDI-TOF-MS spectra were recorded with a MALDI-TOF 'DE PRO' Applied biosystem.

4.2. Synthesis

4.2.1. (UCAUGGU) F_c -4TFA (1**).** Compound **24** (55 mg, $21.7 \mu\text{mol}$) was dissolved in 1.5 mL of TFMSA/thioanisole/TFA (1:0.4:0.3, v/v/v) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 1 and the deprotected product was precipitated out by Et₂O (5 mL). The crude product (79 mg) is obtained after washing with MeOH/Et₂O (1:1, v/v) and drying, and it was further purified on a reverse phase preparative HPLC column (Prep Nova-Pack, HR-C18, $100 \times 40 \text{ mm}^2$) and eluted with 20% acetonitrile in water (0.1% TFA) at a flow rate of 5 mL/min to give **1** (10 mg, 16%) as a white solid after lyophilization. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_{\text{R}} = 9.7 \text{ min}$ ($\lambda_{\text{max}} = 258.4 \text{ nm}$). MS (ESI+) calcd for C₉₆H₁₂₃N₄₁O₂₆ [(M+2H)/2]⁺: 1134.0; found: 1134.0 [(M+2H)/2]⁺. MALDI-TOF-MS Calcd for C₉₆H₁₂₃N₄₁O₂₆ [M+H]⁺: 2267.9; found: 2267.7 [M+H]⁺.

4.2.2. (BocC^ZA^ZBocAllocAllo cBoc) F_c (2**).** To a cold solution (0 °C) of **20** (67 mg, $30.2 \mu\text{mol}$) and DIPEA (34 μL , $196.2 \mu\text{mol}$, 6.5 equiv) in DMF (3 mL), were added HATU (17 mg, $45.9 \mu\text{mol}$, 1.5 equiv) and HOAt (8 mg, $60.4 \mu\text{mol}$, 2 equiv). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CHCl₃ and washed successively with a 1 M aqueous KHSO₄ solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 9:1 to 8:2) to afford **2** (43 mg, 65%) as

a white amorphous powder. TLC (CHCl₃/MeOH 9:1) $R_f = 0.50$. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 21.1$ min ($\lambda_{\max} = 241.8$ and 275.0 nm). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.80–6.60 (m, 26H, (19CH, 7NH)); 6.30–5.65 (m, 4H, (2CH, 2NH)); 5.30–4.40 (m, 16H, (8CH₂)); 4.40–2.80 (m, 49H, (1CH, 24CH₂)); 2.20–1.10 (m, 47H, (10CH₂, 9CH₃)). MS (ESI+) calcd for C₁₀₃H₁₄₅N₂₅O₂₇ [(M+Na+H)/2]⁺: 1094.0; found: 1093.9 [(M+Na+H)/2]⁺.

4.2.3. FmocPheNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CO₂H (3). Compound **12** (829 mg) was dissolved in 16 mL of a dioxane/HCl (12 N) (5:1, v/v) solution. The mixture was stirred at reflux for 8 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was precipitated and triturated in water. Compound **3** (808.0 mg, 100%) was obtained as a white solid after washing, filtering, and drying in vacuo. TLC (EtOAc/MeOH 8:2) $R_f = 0.40$. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 22.4$ min ($\lambda_{\max} = 269.8$ and 303.8 nm). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.80–7.75 (d, 2H, (2CH)); 7.55–7.51 (d, 2H, (2CH)); 7.50–7.10 (m, 9H, (9CH)); 4.40–4.00 (m, 4H, (2CH, CH₂)); 3.25–2.75 (m, 6H, (3CH₂)); 2.40–2.05 (m, 4H, (2CH₂)); 1.70–1.10 (m, 16H, (8CH₂)). MS (ESI+) calcd for C₃₈H₄₇N₃O₆ for [M+Na]⁺: 664.3; found: 664.4 [M+Na]⁺.

4.2.4. Mmt(BocC^ZA^ZBocAllocAllocBoc)OMe (4). To a cold solution (0 °C) of **16** (555 mg, 0.43 mmol), DIPEA (226 μ L, 1.30 mmol, 3 equiv) and **7** (446 mg, 0.49 mmol, 1.13 equiv) in DMF (5 mL), was added PyBop (271 mg, 0.52 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred for 10 min at this temperature then allowed to warm to room temperature (ca. 1 h). The solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CHCl₃ and washed successively with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine, and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 9:1) to afford **4** (709 mg, 79%) as a white amorphous powder. TLC (CHCl₃/MeOH 9:1) R_f 0.46. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 28.2$ min ($\lambda_{\max} = 246.5$ and 275.7 nm). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.80–6.50 (m, 36H, (28CH, 8NH)); 6.00–5.70 (m, 2H, (2CH)); 5.40–4.30 (m, 16H, (8CH₂)); 4.30–2.00 (m, 49H, (21CH₂, 2CH₃, NH)); 1.60–1.00 (m, 27H, (9CH₃)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 173.0–163.0 (10C); 158.0–150.0 (11C); 149.3 (2C); 146.3 146.2 (3C); 138.1 (1C); 135.7 135.3 (2C); 132.8 (2C); 129.9 (2C); 128.6 128.4 128.0 (18C); 126.4 (2C); 121.7 (1C); 117.9 117.4 (2C); 113.3 (2C); 95.7 (1C); 81.1 80.8 80.6 (3C); 70.5 (1C); 67.6 (2C); 66.6 66.5 (2C); 55.3 (1C); 52.5 (1C); 52.0–36.0 (23C); 28.4 28.3 (9C). MS (ESI+) calcd for C₁₀₁H₁₃₀N₂₂O₂₆ [(M+2H)/2]⁺: 1034.5; found: 1034.5 [(M+2H)/2]⁺.

4.2.5. BocNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CO₂Me (10). To a cold solution (0 °C) of BocNH(CH₂)₅CO₂H **8** (181.8 mg, 0.79 mmol), NMM (548 μ L, 3.15 mmol, 4 equiv) and HCl. H₂N(CH₂)₇CO₂Me **9** (200 mg, 0.96 mmol, 1.1 equiv) in DMF (2 mL), was added PyBop (440.2 mg, 0.94 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was

evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CH₂Cl₂ and washed successively with a 1 M aqueous KHSO₄ solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (EtOAc 100%) to afford **10** (270.6 mg, 89%) as a colorless resin. TLC (EtOAc 100%) R_f 0.51. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 17.9$ min. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5.57 (br s, 1H, (NH)); 4.58 (br s, 1H, (NH)); 3.65 (s, 3H, (CH₃)); 3.30–3.00 (m, 4H, (2CH₂)); 2.29 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{2-3} = 7.4$ Hz); 2.15 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{11-12} = 7.4$ Hz); 1.75–1.20 (m, 25H, (8CH₂, 3CH₃)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 174.5 (1C); 172.8 (1C); 156.0 (1C); 79.5 (1C); 51.5 (1C); 39.5 (2C); 36.6 34.0 (2C); 29.8 29.6 29.0 28.8 (4C); 28.5 (3C); 26.7 26.4 25.4 24.8 (4C).

4.2.6. TFA-NH₂(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CO₂Me (11). Compound **10** (706.0 mg, 1.83 mmol) was dissolved in 4 mL of TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was concentrated in vacuo and on addition of Et₂O, **11** (656 mg, 89%) was obtained as a white solid after filtration and drying. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 6.52 (t, 1H, (NH)); 3.65 (s, 3H, (CH₃)); 3.15 (m, 2H, (CH₂)); 2.93 (t, 2H, (CH₂)); 2.30 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{2-3} = 7.4$ Hz); 2.14 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{11-12} = 7.4$ Hz); 1.65–1.25 (m, 18H, (9CH₂)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 174.5 (1C); 173.5 (1C); 51.5 (1C); 39.6 (1C); 35.8 (1C); 34.0 (2C); 30.0–24.0 (9C).

4.2.7. FmocPheNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CO₂Me (12). To a cold solution (0 °C) of FmocPheOH (570.0 mg, 1.47 mmol), DIPEA (768 μ L, 4.41 mmol, 3 equiv) and **11** (587.8 mg, 1.47 mmol, 1.1 equiv) in DMF (4 mL), was added Bop (780.5 mg, 1.76 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CHCl₃ and washed successively with a 1 M aqueous KHSO₄ solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 95:0.5) to afford **12** (829 mg, 86%) as a white amorphous powder. TLC (EtOAc 100%) R_f 0.27. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 25.2$ min ($\lambda_{\max} = 265.0$ and 299.4 nm). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.77–7.73 (d, 2H, (2CH)); 7.55–7.51 (d, 2H, (2CH)); 7.48–7.10 (m, 9H, (9CH)); 6.22 (br s, 1H, (NH)); 5.70 (m, 1H, (NH)); 4.50–4.00 (m, 4H, (2CH, CH₂)); 3.65 (s, 3H, (CH₃)); 3.30–2.90 (m, 6H, (3CH₂)); 2.28 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{2-3} = 7.4$ Hz); 2.10 (t, 2H, (CH₂), ³ $J_{11-12} = 7.2$ Hz); 1.80–1.00 (m, 16H, (8CH₂)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 174.3 (1C); 172.8 (1C); 170.8 (1C); 155.9 (1C); 143.8 (2C); 141.3 (2C); 136.7 (1C); 129.3 (2C); 128.7 (2C); 127.8 (2C); 127.1 127.0 (3C); 125.0 (2C); 120.0 (2C); 67.0 (1C); 56.5 (1C); 51.5 (1C); 47.2 (2C); 39.5 39.1 (2C); 36.3 (1C); 34.0 (1C); 29.7 29.6 (2C); 29.0 26.9 (2C); 26.7 (1C); 26.2 (1C); 24.9 24.8 (2C). MS (ESI+) calcd for C₃₉H₄₉N₃O₆ for [M+Na]⁺: 678.4; found: 678.4 [M+Na]⁺.

4.2.8. Mmt(BocAlloc^Z)OMe (13). To a cold solution (minus 15 °C) of **6** (1.13 g, 1.68 mmol) and **5** (0.82 g, 1.72 mmol, 1.1 equiv) in DMF (20 mL) was added DIPEA (1.1 mL, 6.27 mmol, 3.7 equiv) and Bop (0.89 g, 2.01 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred for 1 h at this temperature then allowed to warm to room temperature (ca. 1 h). The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in EtOAc and washed successively with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, water and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (EtOAc/MeOH 9:1) to afford **13** as a white amorphous powder (1.47 g, 80%). TLC (CH₂Cl₂/MeOH 95:05) *R*_f 0.31. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 9.20–7.05 (m, 22H, (19CH, 3NH)); 6.90–6.70 (m, 2H, (2CH)); 6.00–5.60 (m, 1H, (CH)); 5.40–4.90 (m, 6H, (3CH₂)); 4.60–4.30 (m, 2H, (CH₂)); 4.15–3.20 (m, 22H, (2CH₃, 8CH₂)); 2.60–2.30 (m, 2H, (CH₂)); 1.60–1.35 (m, 9H, (3CH₃)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 171.2 170.1 169.6 (3C); 167.1 (1C); 158.2 (1C); 156.4 155.9 (2C); 152.1 (1C); 151.8 (1C); 151.1 (1C); 149.2 (1C); 146.0–145.0 (3C); 137.2 (1C); 135.6 (1C); 132.2 (1C); 129.8 (2C); 129.0–127.7 (13C); 126.6 (2C); 121.5 (1C); 11.7 (1C); 113.3 (2C); 80.7 (1C); 70.7 (1C); 67.6 (1C); 66.9 (1C); 55.2 (1C); 54.0–48.0 (7C); 44.3 42.6 (2C); 38.3 36.8 (2C); 28.4 (3C). MS (ESI+) calcd for C₅₇H₆₇N₁₁O₁₂ [M+H]⁺: 1098.5 and for [M+Na]⁺: 1120.5; found: 1098.0 [M+H]⁺ and 1120.3 [M+Na]⁺.

4.2.9. Mmt(BocHA^Z)OMe (14). Compound **13** (210 mg, 0.19 mmol) and Et₂NH (297 μL, 2.87 mmol, 15 equiv) were dissolved in CH₂Cl₂ (2 mL) and Pd[P(Ph)₃]₄ (22 mg, 19.1 μmol, 0.1 equiv) was added. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. The solvent was concentrated under reduced pressure and the crude residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5 to 9:1) to afford **14** (190 mg, 98%) as a yellowish amorphous powder. TLC (CHCl₃/MeOH 95:05) *R*_f 0.28. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t*_R = 21.4 min (λ_{max} = 273.3 nm). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 9.00–7.00 (m, 22H, (19CH, 3NH)); 6.90–6.70 (m, 2H, (2CH)); 5.30–4.95 (m, 4H, (2CH₂)); 4.32 (m) and 4.10 (m) (s, 2H, (CH₂)); 3.90–2.90 (m, 18H, (2CH₃, 6CH₂)); 2.70–1.85 (m, 3H, (CH₂, NH)); 1.60–1.20 (m, 9H, (3CH₃)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 173.1 (1C); 169.7 169.6 (2C); 166.6 (1C); 158.3 (1C); 156.3 (1C); 152.7 (1C); 151.7 (1C); 151.0 (1C); 149.4 (1C); 145.9 (2C); 144.3 (1C); 137.6 (1C); 135.6 (1C); 129.9 (2C); 128.7 128.6 128.1 (13C); 126.8 126.7 (2C); 121.5 (1C); 113.3 (2C); 81.2 (1C); 70.6 (1C); 67.8 (1C); 55.3 (1C); 53.5 53.1 52.8 52.6 49.6 48.3 47.9 (7C); 44.0 (1C); 42.6 (1C); 39.1 (1C); 37.3 (1C); 28.4 (3C). MS (ESI+) calcd for C₅₃H₆₃N₁₁O₁₀ [M+H]⁺: 1014.5; found: 1014.0 [M+H]⁺.

4.2.10. Mmt(BocC^ZA^Z)OMe (15). A solution of **14** (631 mg, 0.62 mmol), C^ZCH₂CO₂H (221 mg, 0.73 mmol, 1.17 equiv), DIPEA (326 μL, 1.87 mmol, 3 equiv) in DMF (3 mL) was stirred at 0 °C. HATU (284 mg, 0.75 mmol, 1.2 equiv) was then added. The mixture was stirred for 15 min at 0 °C then allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The sol-

vent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was taken up in EtOAc and washed successively with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, and with water and then dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 9.5:0.5) to afford **15** as a white amorphous powder (605 mg, 75%). TLC (EtOAc/MeOH 8:2) *R*_f 0.26. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t*_R = 25.9 min (λ_{max} = 246.5 and 274.5 nm). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 10.40–6.60 (m, 31H, (28CH, 3NH)); 5.50–4.40 (m, 8H, (4CH₂)); 4.40–2.60 (m, 22H, (8CH₂, 2CH₃)); 2.33 (br s, 2H, (CH₂)); 1.60–1.00 (m, 9H, (3CH₃)). ¹³C NMR (50.3 MHz, CDCl₃) δ 170.8 170.3 169.5 168.1 167.7 (5C); 163.5 (1C); 158.0 (1C); 156.0 (1C); 152.6 152.4 151.6 (5C); 150.3 149.4 (2C); 146.1 (2C); 145.2 (1C); 137.9 (1C); 135.8 135.2 (2C); 129.8 (2C); 128.5 128.4 128.3 128.0 (18C); 126.5 (2C); 121.4 (1C); 113.3 (2C); 95.5 (1C); 80.7 (1C); 70.4 (1C); 67.6 (2C); 55.3 (1C); 53.5 (1C); 52.6 52.0 50.8 50.2 48.3 47.6 (5C); 44.6 (1C); 42.5 (1C); 37.4 36.7 (2C); 28.4 (3C). MS (ESI+) calcd for C₆₇H₇₄N₁₄O₁₄ [M+H]⁺: 1299.5 and for [M+Na]⁺: 1321.5; found: 1299.0 [M+H]⁺ and 1321.2 [M+Na]⁺.

4.2.11. Mmt(BocC^ZA^Z)OH (16). Compound **15** (147 mg, 0.11 mmol) was dissolved in THF (3.5 mL). To the solution, were added three times, at 5 min intervals, 1 M aqueous LiOH (230 μL, 0.23 mmol, 2 equiv). The mixture was stirred for 15 min at room temperature, then the pH was adjusted to 7 with a 0.5 M HCl solution and the aqueous layer was extracted with CHCl₃. The organic extract was dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to dryness to afford **16** (140.0 mg, 99%) as a white amorphous powder. TLC (EtOAc/MeOH 7:3) *R*_f 0.28. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t*_R = 24.4 min (λ_{max} = 246.5 and 275.7 nm). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.80–6.50 (m, 31H, (28CH, 3NH)); 5.40–4.30 (m, 8H, (4CH₂)); 4.30–2.70 (m, 21H, (8CH₂, CH₃)); 1.60–1.00 (m, 9H, (3CH₃)). MS (ESI) calcd for C₆₆H₇₂N₁₄O₁₄ [M–H][–]: 1283.5; found: 1283.2 [M–H][–].

4.2.12. TFA·H(BocC^ZA^ZBocAllocBoc)OMe (17). Compound **4** (509 mg, 0.25 mmol) was dissolved in 3 mL of a 2% TFA/CH₂Cl₂ (v/v) solution. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was concentrated in vacuo and on addition of Et₂O, **17** (422 mg, 88%) was obtained as a yellowish solid after filtration and drying. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t*_R = 20.6 min (λ_{max} = 247.6 and 274.5 nm). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.90–6.50 (m, 24H, (24CH)); 6.00–5.65 (m, 2H, (2CH)); 5.40–4.30 (m, 16H, (8CH₂)); 4.30–2.00 (m, 45H, (21CH₂, CH₃)); 1.60–1.10 (m, 27H, (9CH₃)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 174.0–163.0 (10C); 162.2 161.5 (1C (COO[–] (TFA))); 158.0–150.0 (10C); 149.2 (2C); 145.2 (1C); 135.7 135.3 (2C); 132.7 (2C); 128.6 (10C); 121.1 (1C); 119.8 117.4 114.0 (1C (CF₃ (TFA))); 117.9 117.2 (2C); 95.7 (1C); 81.3 81.1 80.7 (3C); 67.8 (2C); 66.6 66.5 (2C); 54.0–35.0 (24C); 28.2 (9C). MS (ESI+) calcd for C₈₁H₁₁₄N₂₂O₂₅ [M+H]⁺: 1795.8; found: 1795.5 [M+H]⁺.

4.2.13. FmocPheNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CONH(Boc^Z-A^ZBocAllocAllocBoc)OMe (18). To a cold solution (0 °C) of **3** (58 mg, 84.7 μmol, 1.1 equiv), DIPEA (43 μL, 0.25 mmol, 3 equiv) and **17** (158 mg, 82.4 μmol, 1 equiv) in DMF (0.8 mL), was added PyBop (52 mg, 99.2 μmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred for 10 min at this temperature then allowed to warm to room temperature (ca. 1 h). The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CHCl₃ and washed successively with a 1 M aqueous KHSO₄ solution, a saturated aqueous NaHCO₃ solution, brine and finally dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 9:1 to 8.5:1.5) to afford **18** (183 mg, 91%) as a white amorphous powder. TLC (EtOAc/MeOH 6:4) *R_f* 0.41. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 26.2 min (λ_{\max} = 265.5 nm). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (ma.) 8.60 (mi.) (s, 1H, (CH)); 8.11 (m, 1H, (CH)); 7.70 7.69 (d, 2H, (2CH)); 7.60–7.05 (m, 23H, (23CH)); 6.80–5.70 (m, 4H, (2CH, 2NH)); 5.30–4.43 (m, 16H, (8CH₂)); 4.43–2.40 (m, 55H, (2CH, 25CH₂, CH₃)); 2.15–1.80 (m, 4H, (2CH₂)); 1.60–1.10 (m, 43H, (8CH₂, 9CH₃)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 174.5–166.0 (12C); 163.3 (1C); 156.8–154.5 (6C); 152.8–150.0 (5C); 149.4 (2C); 144.8 (1C); 143.8 (2C); 141.3 (2C); 136.8 (1C); 135.7 135.3 (2C); 132.6 (2C); 129.3 (2C); 128.8–128.0 (12C); 127.7 (2C); 127.1 126.9); 125.1 125.0 (2C); 121.2 (1C); 120.0 (2C); 117.9 (2C); 95.6 (1C); 81.1 80.8 80.6 (3C); 67.7 67.4 (2C); 67.0 (1C); 66.6 66.4 66.3 (2C); 56.2 (1C); 53.8–36.6 (26C); 47.2 (2C); 36.5 (1C); 36.2 (1C); 29.7 29.3 (2C); 29.0 28.6 (2C); 28.4–27.7 (9C); 26.6 (1C); 26.2 (1C); 25.5 24.1 (2C). MS (ESI+) calcd for C₁₁₉H₁₅₉N₂₅O₃₀ [M+Na]⁺: 2441.1; found: 2441.4 [M+Na]⁺.

4.2.14. HPhNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CONH(Boc^ZA^Z-BocAllocAllocBoc)OMe (19). Compound **18** (352 mg, 0.15 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2 mL) and Et₃NH (2 mL, 19.33 mmol, 130 equiv) was added at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. The solvent was concentrated under reduced pressure. The residue was taken up in CH₂Cl₂ (1 mL) and precipitated with Et₂O at 0 °C. Compound **19** (320 mg, 97%) was obtained as a white amorphous powder after triturating in Et₂O and drying. TLC (CHCl₃/MeOH 8.5:1.5) *R_f* 0.55. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 20.8 min (λ_{\max} = 241.8 and 273.8 nm). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.80–6.50 (m, 19H, (19CH)); 6.50–5.70 (m, 4H, (2CH, 2NH)); 5.40–4.30 (m, 16H, (8CH₂)); 4.30–2.50 (m, 52H, (CH, 24CH₂, CH₃)); 2.30–2.00 (m, 4H, (2CH₂)); 1.60–1.00 (m, 43H, (8CH₂, 9CH₃)). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 175.1 174.5 174.0 171.2 170.0 169.5 168.7 168.3 168.0 167.7 164.5 164.3 (12C); 163.6 (1C); 156.8 (5C); 153.5–149.0 (7C); 146.0 (1C); 137.4 (1C); 135.7 135.2 (2C); 132.7 (2C); 129.3 (2C); 129.0–126.0 (13C); 121.6 (1C); 118.2–116.0 (2C); 95.7 (1C); 81.5–80.2 (3C); 67.6 67.5 (2C); 66.6 66.4 66.3 (2C); 56.2 (1C); 54.0–37.5 (27C); 36.6 (1C); 36.4 (1C); 30.3–27.5 (13C); 26.8–26.0 (2C); 25.7–24.9 (2C). MS (ESI+) calcd for C₁₀₄H₁₄₉N₂₅O₂₈ [M+Na]⁺: 2219.1; found: 2219.5 [M+Na]⁺.

4.2.15. HPhNH(CH₂)₅CONH(CH₂)₇CONH(Boc^ZA^Z-BocAllocAllocBoc)OH.HCl (20). Compound **20** was

obtained from **19** (72 mg, 32.8 μmol), following the procedure described above for the preparation of **16**. After acidification, the mixture was concentrated in vacuo and the residue purified on a Sephadex LH-20 gel column in methanol to give compound **20** (68 mg, 93%) as a white amorphous powder. TLC (CHCl₃/MeOH 8.5:1.5) *R_f* 0.19. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 19.3 min (λ_{\max} = 241.8 and 271.4 nm). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.65–6.65 (m, 19H, (19CH)); 6.00–5.80 (m, 2H, (2CH)); 5.40–4.30 (m, 16H, (8CH₂)); 4.30–2.70 (m, 49H, (CH, 24CH₂)); 2.20–2.05 (m, 4H, (2CH₂)); 1.60–1.10 (m, 43H, (8CH₂, 9CH₃)). MS (ESI+) calcd for C₁₀₃H₁₄₇N₂₅O₂₈ [M+H]⁺: 2183.1; found: 2183.1 [M+H]⁺.

4.2.16. (Boc^ZA^ZBocHHBoc)F_c (21). Compound **21** (135 mg, 62.5 μmol) and Et₂NH (291 μL, 2.81 mmol, 45 equiv) were dissolved in DMF (180 μL), and Pd[P(Ph)₃]₄ (14 mg, 12.5 μmol, 0.2 equiv) was added. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was concentrated under reduced pressure. The residue was taken up in methanol (0.1 mL) and precipitated with Et₂O at 0 °C. Compound **21** (100 mg, 95%) was obtained as a yellowish amorphous powder after triturating in Et₂O and drying. TLC (CHCl₃/MeOH 8:2) *R_f* 0.48. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 19.9 min (λ_{\max} = 241.8 and 269.1 nm). MS (ESI+) calcd for C₉₅H₁₃₇N₂₅O₂₃ [M+Na]⁺: 2019.0; found: 2019.1 [M+Na]⁺.

4.2.17. (Boc^ZA^ZBocG^{OBn}G^{OBn}Boc)F_c (22). To a solution of **21** (100 mg, 50.1 μmol), G^{OBn}CH₂CO₂H (45 mg, 150.3 μmol, 3 equiv), and DIPEA (87 μL, 500.1 μmol, 10 equiv) in DMF (150 μL), were added at 0 °C, HATU (57 mg, 150.3 μmol, 3 equiv) and HOAt (14 mg, 100.2 μmol, 2 equiv). After 2 h of stirring at room temperature, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was taken up in CHCl₃ and washed successively with a saturated aqueous NaHCO₃ solution, water and dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed in vacuo and the residue was purified by column chromatography (CHCl₃/MeOH 1:1) to afford **22** (122 mg, 95%) as a white amorphous powder. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 23.4 min (λ_{\max} = 243.0 and 278.6 nm). MS (ESI+) calcd for C₁₂₃H₁₅₉N₃₅O₂₇ [M+Na]⁺: 2581.2 and for [(M+2Na)/2]⁺: 1302.1; found: 2581.2 [M+Na]⁺ and 1302.0 [(M+2Na)/2]⁺.

4.2.18. (HC^ZA^ZHGGH)F_c·5TFA (23). Compound **22** (147 mg, 57.3 μmol) was dissolved in 2 mL of a solution of TFA/CH₂Cl₂/TIS (1:1:0.25, v/v/v) at 0 °C. The mixture was stirred at room temperature for 30 min and the deprotected product was precipitated out by Et₂O (10 mL). Compound **23** (98 mg, 93%) was obtained as a yellowish solid after washing with Et₂O, filtration and drying. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) *t_R* = 13.5 min (λ_{\max} = 243.0 and 278.6 nm). MS (ESI+) calcd for C₉₄H₁₂₈N₃₅O₂₁ [(M+2H)/2]⁺: 1040.0; found: 1040.0[(M+2H)/2]⁺.

4.2.19. (UC^ZA^ZUGGU)F_c (24). To a solution of **23** (71 mg, 26.7 μmol), UCH₂CO₂H (18 mg, 106.7 μmol, 4 equiv) and DIPEA (93 μL, 533.5 μmol, 20 equiv) in

DMF (130 μ L), were added at 0 °C, HATU (43 mg, 112.0 μ mol, 4.2 equiv) and HOAt (14 mg, 106.7 μ mol, 4 equiv). After stirring at room temperature for 3 h, the product was precipitated out by a saturated aqueous NaHCO₃ solution (10 mL). The precipitate was washed successively with water, methanol, and Et₂O. After drying, compound **24** (60 mg, 88%) was obtained as a white amorphous powder. HPLC (A/B 80:20 to 0:100 over 30 min) $t_R = 13.8$ min ($\lambda_{max} = 257.2$ nm). MS (ESI+) calcd for C₁₁₂H₁₃₅N₄₁O₃₀ [(M+2H)/2]⁺: 1268.0 and for [(M+3H)/3]⁺: 845.7; found: 1268.1 [(M+2H)/2]⁺ and 845.6 [(M+3H)/3]⁺.

5. Experimental (virology)

5.1. Plasmid construction

An original bicistronic expression vector, termed *pFl-HCV IRES-hRl* was used in this study. Details of the cloning procedure will be described elsewhere. Briefly, this construction contains the coding sequence of the firefly luciferase (Promega) under the control of cytomegalovirus and T7 promoter followed by HCV 5'-UTR genomic sequence (HCV nucleotides 19–355) corresponding to the internal ribosome entry site (IRES) and the coding sequence for the humanized Renilla luciferase (Promega) in the pcDNA 3.1 + vector (Invitrogen). HCV fragment (HCV IRES) was amplified by RT-PCR with RNA extracted from serum of a chronically HCV infected patient. No difference was observed between the sequence obtained compared with a standard 1a genotype HCV genome.

5.2. In vitro coupled transcription–translation assays

In vitro coupled transcription–translation assays were performed in 25 μ L in a mixture containing 20 μ L of TnT Quick Master Mix (Promega), 1 μ L of methionine 1 mM, 1 μ L of pFl-HCV IRES-hRl at a concentration of 0.5 μ g/ μ L and 3 μ L of PNA, diluted in water. Concentration from 0.5 to 60 μ M were used. A 90 min incubation at 30 °C was performed. All this experiments were made in triplicates, at least twice.

5.3. Measurement of luciferase activity

The enzymatic activities of firefly and humanized Renilla were measured using dual luciferase reporter assay system (Promega), as recommended by the manufacturer. Results are the ratio of humanized Renilla luciferase activity compared to firefly luciferase activity, measured by light emission integrated over a period of 1 seconde in a Luminoskan Ascent.

Acknowledgments

We are grateful to Jean-Marie Guignonis for the mass spectroscopy analyses. This work was supported by the 'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA' (ANRS), by the 'Association de la Recherche contre le Cancer' (ARC) and by Fight Aids Monaco.

References and notes

- Bukh, J.; Purcell, R. H.; Miller, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 4942.
- Kieft, J. S.; Zhou, K.; Jubin, R.; Murray, M. G.; Lau, J. Y.; Doudna, J. A. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 513.
- Kieft, J. S.; Zhou, K.; Grech, A.; Jubin, R.; Doudna, J. A. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 370.
- Sarnow, P. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2801.
- Honda, M.; Brown, E. A.; Lemon, S. M. *RNA* **1996**, *2*, 955.
- Kieft, J. S.; Zhou, K.; Jubin, R.; Doudna, J. A. *RNA* **2001**, *7*, 194.
- Lehmann, T. J.; Eisenhardt, S.; Engels, J. W. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1689.
- Lima, W. F.; Brown-Driver, V.; Fox, M.; Hanecak, R.; Bruce, T. W. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272.
- Vidalin, O.; Major, M. E.; Rayner, B.; Imbach, J. L.; Trepo, C.; Inchauspe, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2337.
- Wakita, T.; Wands, J. R. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14205.
- Wakita, T.; Moradpour, D.; Tokushihge, K.; Wands, J. R. *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 217.
- Alt, M.; Renz, R.; Hofschneider, P. H.; Paumgartner, G.; Caselmann, W. H. *Hepatology* **1995**, *22*, 707.
- Alt, M.; Renz, R.; Hofschneider, P. H.; Caselmann, W. H. *Arch. Virol.* **1997**, *142*, 589.
- Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Fox, M. C.; Azad, R. F.; Furusako, S.; Nozaki, C.; Ford, C.; Sasmor, H.; Anderson, K. P. *J. Virol.* **1996**, *70*, 5203.
- Liu, X. F.; Zhou, X. T.; Zou, S. Q. *Hepatobiliary. Pancreat. Dis. Int.* **2004**, *3*, 115.
- Mizutani, T.; Kato, N.; Hirota, M.; Sugiyama, K.; Murakami, A.; Shimotohno, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 906.
- Wu, C. H.; Wu, G. Y. *Gastroenterology* **1998**, *114*, 1304.
- Zhang, H.; Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Azad, R.; Conklin, B.; Fox, M. C.; Anderson, K. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 347.
- Alt, M.; Eisenhardt, S.; Serwe, M.; Renz, R.; Engels, J. W.; Caselmann, W. H. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, *29*, 868.
- McCaffrey, A. P.; Meuse, L.; Karimi, M.; Contag, C. H.; Kay, M. A. *Hepatology* **2003**, *38*, 503.
- Amberg, S.; Tamke, A.; Caselmann, W. H.; Engels, J. W. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1631.
- Tallet-Lopez, B.; Aldaz-Carroll, L.; Chabas, S.; Dausse, E.; Staedel, C.; Toulmé, J. J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 734.
- Nulf, C. J.; Corey, D. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3792.
- Nielsen, P. E. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 233, Review.
- Eguchi, Y.; Tomizawa, J. *Cell* **1990**, *60*, 199.
- Paillart, J. C.; Marquet, R.; Skripkin, E.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B. *Biochimie* **1996**, *78*, 639.
- Wagner, C.; Palacios, I.; Jaeger, L.; St. Johnston, D.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Brunel, C. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 511.
- Toulmé, J. J. *J. Curr. Opin. Mol. Ther.* **2000**, *2*, 318.
- Aldaz-Carroll, L.; Tallet, B.; Dausse, E.; Yurchenko, L.; Toulmé, J. J. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5883.
- Ennifar, E.; Walter, P.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C.; Dumas, P. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 1064.
- Brunel, C.; Marquet, R.; Romby, P.; Ehresmann, C. *Biochimie* **2002**, *84*, 925.
- Pattabiraman, N.; Martinez, H. M.; Shapiro, B. A. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, *20*, 397.
- Windbichler, N.; Werner, M.; Schroeder, R. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6419.

34. Depecker, G.; Patino, N.; Di Giorgio, C.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D.; Bailly, C.; Aubertin, A. M.; Condom, R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 74.
35. Schwergold, C.; Depecker, G.; Di Giorgio, C.; Patino, N.; Jossinet, F.; Ehresmann, B.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D.; Condom, R. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5675.
36. Depecker, G.; Schwergold, C.; Di Giorgio, C.; Patino, N.; Condom, R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8303.
37. Caldarelli, S.; Depecker, G.; Patino, N.; Di Giorgio, A.; Barouillet, T.; Doglio, A.; Condom, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4435.
38. Ducongé, F.; Toulmé, J. J. *RNA* **1999**, *5*, 1605.
39. Beaurain, F.; Di Primo, C.; Toulmé, J. J.; Laguerre, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4275.
40. Da Rocha Gomes, S.; Dausse, E.; Toulmé, J. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 820.

B - INTRODUCTION ET BUT DE L'ETUDE

L'évaluation de PNA dirigés contre l'IRES du VHC réalisé dans l'étude 2 et par une autre équipe (Nulf et Corey, 2004a) montre qu'il est possible d'inhiber la traduction *in vitro* du virus de l'hépatite C. Cependant, comme nous l'avons montré, l'utilisation des PNA comme agents thérapeutiques est problématique à cause des problèmes de pénétration cellulaire des composés en partie lié à l'absence de charges.

En parallèle de l'étude 2, nous avons travaillé sur une stratégie visant à **synthétiser puis à évaluer un PNA cyclique** dirigé contre la région du domaine IV de l'IRES. Cette région, comme nous l'avons expliqué dans les données bibliographiques et dans l'étude 2, est structurée par des appariements au sein de l'ARN et contient le codon d'initiation AUG. Sa conformation permet la liaison de la sous-unité ribosomale 40S.

→ VOIR FIGURE 1 DE L'ARTICLE.

Le but de l'étude était d'**inhiber la structure en épingle à cheveux (*stem-loop*) en mimant les interactions intramoléculaires boucle-boucle** qui sont très présentes dans les associations ARN-ARN et qui permettent la réalisation de nombreuses fonctions biologiques. En effet les bases présentes dans de telles boucles sont particulièrement exposées et accessibles et donc très fréquemment impliquées dans des reconnaissances moléculaires et dans une hybridation ARN-ARN. De nombreux complexes boucle-boucle sont décrits dans la littérature (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Eguchi et Tomizawa, 1990; Paillart *et al.*, 1996; Toulme, 2000; Wagner *et al.*, 2001). Dans le cas du VIH, l'interaction de deux boucles auto-complémentaires de signal d'initiation de la dimérisation (DIS) est par exemple responsable de la dimérisation de l'ARN du VIH (Brunel *et al.*, 2002; Ennifar *et al.*, 2001; Pattabiraman *et al.*, 2002). Concernant le VHC, des aptamères ARN dirigés contre la région apicale du domaine II (Kikuchi *et al.*, 2003) et récemment contre la région apicale du domaine IIIId (Kikuchi *et al.*, 2005) ont été déjà été identifiés. Le principe de telles interactions est schématisé dans la Figure 88.

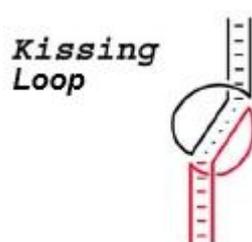


Figure 88 : Représentation schématique d'un complexe boucle-boucle. (Toulme *et al.*, 2003)

Nos travaux font suite à un travail amorcé par l'équipe collaboratrice de Nice qui a montré l'activité biologique de molécules cycliques (Depecker *et al.*, 2004) qui interfèrent *in vitro* avec la dimérisation du génome du VIH. L'intérêt de tels composés de **type PNA** (six résidus), serait de permettre une **meilleure sélectivité** en comparaison avec des analogues linéaires et par rapport aux antisens classiques d'avoir **un faible poids moléculaire**.

C - RESULTATS

Design du composé PNA cyclique

Un composé cyclique contenant une partie PNA heptamérique complémentaire à sept résidus de la boucle IV de l'IRES du VHC et un *spacer* reliant les extrémités C- et N- terminales du PNA a été synthétisé. La synthèse, réalisée en parallèle des études sur les PNA linéaires (étude 2), s'est basé sur la séquence du PNA-11.

→ VOIR FIGURE 2 DE L'ARTICLE.

Études de modélisation moléculaire

Des études ont été ensuite réalisées pour **ajuster la longueur du *spacer*** en vue d'optimiser les interactions boucle-boucle et **introduire un résidu phénylalanine** à l'extrémité C-terminale de la partie PNA en vue d'augmenter la stabilité du composé par des interactions entre les nucléobases adjacentes. Dans une modèle d'interaction entre le domaine IV de l'IRES du VHC et le PNA cyclique, on observe la **formation de deux doubles hélices stables**. L'axe de ces doubles hélices est colinéaire. Le résidu A339 du VHC n'est pas strictement aligné avec les autres résidus de l'ARN mais cette rupture assure la continuité de la séquence ARN sans faire un lien dans la structure en double hélice. Les sept nucléotides du PNA interagissent par des liaisons Watson & Crick avec les bases de la boucle ARN.

→ VOIR FIGURE 3 DE L'ARTICLE.

Chimie de synthèse du composé

Cette partie a été réalisée dans le laboratoire de Nice du Pr. Roger Condom. Une stratégie « mixte » originale de synthèse a été utilisée (Depecker *et al.*, 2004). Pour les détails, se reporter à la publication.

→ VOIR SCHEMAS 1 A 4 DE L'ARTICLE.

Effet inhibiteur *in vitro* de la traduction IRES dépendante du VHC

De manière similaire aux essais réalisés dans l'étude 2, nous avons étudié l'effet du composé cyclique sur la traduction d'un plasmide contenant l'IRES du VHC isolé chez un patient non répondeur à la bithérapie actuelle, en lysat de réticulocytes de lapin, dans un système couplé. Différentes concentrations du composé ont été mélangées à la construction pFl-hRI NR1. Les quantités de protéines de luciférase Firefly (synthétisées par un mécanisme cap-dépendant) et de luciférase Renilla humanisée (synthétisées par un mécanisme IRES dépendant et potentiellement inhibé par les PNA) ont été évaluées.

Une inhibition dose dépendante de la traduction virale a été observée, avec un **effet maximal à 30µM**, correspondant approximativement à l'IC₅₀ du composé. Des concentrations plus importantes (jusqu'à 60µM) montrent une inhibition plus importante de la synthèse de Renilla mais aussi des effets non spécifiques sur la

synthèse de la protéine Firefly. Des effets similaires ont été observés en testant cette molécule dans un système non couplé (l'ARN correspondant à la construction est obtenu par transcription *in vitro* puis traduit dans un deuxième temps en présence du PNA cyclique). Rappelons que dans l'étude 2, nous avons montré que le composé linéaire analogue (PNA-11) avait une IC_{50} de l'ordre de 200nM, soit une perte d'efficacité de 150 fois entre le PNA linéaire et son analogue cyclique.

→ VOIR FIGURES 4 ET 5 DE L'ARTICLE.

D - DISCUSSION

Un composé cyclique à base de PNA, contenant une séquence héptamérique complémentaire à la boucle apicale du domaine IV de l'IRES du VHC, a été synthétisé dans le but de **mimer les complexes boucle-boucle hautement stables**. En comparaison, le PNA linéaire (PNA-11) correspondant a été également synthétisé et évalué (les résultats sont présentés dans l'étude 2). L'objectif de l'étude était d'évaluer ce composé cyclique, d'un **poids moléculaire plus faible** et qui devrait permettre une **sélectivité plus importante** comparé à un analogue linéaire.

Les premiers essais *in vitro* réalisés en lysats de réticulocytes de lapin montrent que ce composé est capable d'inhiber la traduction IRES dépendante du VHC de manière concentration dépendante. Ces résultats suggèrent pour la première fois qu'un dérivé cyclique des PNA peut être un inhibiteur potentiel du VHC.

Ces travaux ayant été réalisés en parallèle avec ceux de l'étude 2, il s'est avéré que le choix du composé PNA-11 utilisé pour réaliser la molécule cyclique était une erreur. Le choix du PNA-10, le plus actif dans l'étude 2, aurait été plus judicieux. Il n'a pas été possible de synthétiser ce dérivé à ce jour, mais avec les enseignements de ce premier composé, la réalisation de cette synthèse pourrait se révéler très intéressante.

En ce qui concerne les résultats obtenus, il apparait que le composé cyclique est 150 fois moins actif que son analogue linéaire ($IC_{50} = 30\mu M$ vs $200nM$). Ces résultats, bien que décevants, peuvent s'expliquer de plusieurs façons comme décrits dans plusieurs travaux de l'équipe de JJ. Toulmé (Aldaz-Carroll *et al.*, 2002; Beaurain *et al.*, 2003; Da Rocha Gomes *et al.*, 2004; Duconge et Toulme, 1999). Dans leurs travaux, ils ont identifié par sélection *in vitro* des aptamères dirigés contre plusieurs boucles d'ARN et agissant par des interactions boucle-boucle. Dans tous les cas, les boucles des aptamères qui présentent les activités les plus importantes ne sont pas strictement complémentaires à la région apicale de la boucle ciblée. Par exemple, un aptamère ciblant la région IV de l'IRES interagit avec seulement 6 résidus sur les 7 présents sur le domaine IV. Ces résultats semblent alors indiquer que **la structure du PNA cyclique synthétisé ne serait pas forcément la plus adaptée pour une interaction de haute affinité**.

De nouvelles modélisations moléculaires, la synthèse de la séquence identifiée par Toulmé et col. ainsi que la synthèse d'un composé cyclique comportant le PNA-10 sont en cours.

E - CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer pour la première fois qu'un **dérivé cyclique de PNA pouvait avoir une action inhibitrice sur la traduction IRES-dépendante du VHC**. Bien que les résultats soient décevants en termes d'activité en comparaison avec un analogue linéaire, cela ne remet pas en cause le rationnel de l'étude.

Les PNA sont aujourd'hui des molécules bien caractérisées et dont le potentiel d'action est important. Ils présentent une excellente résistance aux nucléases, sont extrêmement stables aux températures physiologiques et reconnaissent leurs cibles avec une spécificité très bonne. Le frein majeur à leur utilisation clinique est la difficulté de les faire pénétrer dans les cellules du fait de leur absence de charges comme nous l'avons montré dans l'étude 2.

La réalisation de couplages avec des peptides augmentant la pénétration en cellules est intéressante mais conduit à un allongement important du PNA, ce qui va à l'encontre d'un objectif de baisse de la masse moléculaire du composé. La possibilité de rendre des PNA cycliques pourrait permettre dans le futur de **conjuguer les excellentes propriétés des PNA** avec un **mode d'action de type boucle-boucle**, le tout en **diminuant encore la taille du composé** et en pouvant apporter des **modifications sur le cycle** qui permettraient d'augmenter la pénétration en cellules.

Les résultats présentés dans cette étude, bien que très préliminaires, ouvrent de nouvelles perspectives mais devront être confirmées par de nouvelles synthèses qui prendront en compte les observations réalisées dans les études 2 et 3.

Conclusions et perspectives

De part sa prévalence élevée et une sécurité transfusionnelle encore non optimale, l'infection par le VHC dans les pays en voie de développement constitue un problème très préoccupant. Dans les pays industrialisés, les risques de transmission sont maintenant maîtrisés et la contamination par usage de drogues et le risque nosocomial représentent désormais les modes de contamination les plus fréquents. Dans les pays où le virus a émergé très tôt, une augmentation notable de la survenue de complications hépatiques s'observe d'ores et déjà. Le virus de l'hépatite C représente donc toujours **un problème majeur de santé publique**.

La bithérapie actuelle, une combinaison entre un interféron alpha-*pégylé* et la ribavirine n'est efficace que dans 50% des cas et est un traitement difficile à supporter. De nombreuses autres molécules sont en développement clinique, notamment des anti-protéases et des anti-polymérase. Les études *in vitro* et les données des premiers essais cliniques montrent que ces molécules sont efficaces mais qu'elles favorisent l'apparition de résistances, comme observé dans les traitements contre le VHC et le VIH. **Il est donc nécessaire d'améliorer la bithérapie actuelle et d'étudier de nouvelles perspectives thérapeutiques capables de compléter les approches multi-thérapeutiques futures.**

C'est donc à partir de ce constat que s'est inscrit notre travail, avec comme contexte la mise au point des modèles des « réplicons VHC » puis ses dérivés autorisant l'étude de la réplication du virus en culture de cellules et récemment l'apparition d'un modèle de réplication complet du virus, une véritable révolution 16 ans après la découverte du virus.



Dans la **première étude**, conduite en collaboration avec Vanessa Escuret, nous avons essayé de répondre à la première partie de notre problématique, c'est-à-dire d'améliorer la bithérapie actuelle en améliorant l'interféron aujourd'hui utilisé en clinique. A la différence des recherches qui étaient menées au moment de l'étude avec par exemple les travaux sur un interféron consensus ou sur l'albuféron (voir p. 75), nous avons cherché à tirer parti de la diversité naturelle qui existe parmi les gènes codant les interférons-alpha variants. Nous avons identifié un interféron, GEA007.1 qui possède une activité inhibitrice de la réplication plus puissante que celle de l'IFN- α 2b, dans le modèle du réplicon sous-génomique du VHC. Cette activité antivirale plus importante est associée à une induction plus importante des voies de transduction du signal et a permis d'éliminer le VHC des cellules après une administration prolongée.

Ces résultats sont prometteurs mais nécessitent la poursuite de l'évaluation de ces composés, notamment lors d'essais cliniques, afin de savoir si l'augmentation d'activité *in vitro* s'accompagne d'un bénéfice clinique, en particulier pour les patients non répondeurs au traitement actuel.

Dans la **deuxième étude**, nous avons essayé de répondre à l'autre partie de la problématique, c'est-à-dire d'étudier de nouvelles perspectives thérapeutiques qui permettrait, à terme, d'améliorer la multi-thérapie IFN + ribavirine + inhibiteurs de protéases ou de polymérase. Nous avons orienté nos études vers une approche antisens ciblant la région la mieux conservée du génome virale et indispensable à la traduction/réplication, la région IRES. Nous avons choisi de travailler avec des molécules antisens de seconde génération, les Peptide Nucleic Acids (PNA) qui présentent des profils de sélectivité et de résistance aux nucléases très bons. Nous avons identifié un composé, le PNA-10 qui a une très bonne activité inhibitrice du VHC avec une IC50 de l'ordre de 54nM *in vitro*. L'intérêt de l'utilisation de PNA est confirmé, nos résultats montrant que des analogues phosphorothioates de même taille et

séquence sont incapables d'inhiber la traduction IRES dépendante. De plus, il apparaît que les PNA ont un excellent pouvoir discriminant ; l'introduction d'un seul mésappariement entraîne une baisse importante de l'efficacité des composés.

Nous avons cependant mis en évidence une limitation, déjà connue, à leur usage. En effet, la pénétration en cultures de cellules des molécules est très difficile du fait de l'hydrophobicité des PNA. Nous avons quand même réussi à obtenir une inhibition d'un cycle complet de réplication en électroporant les PNA avec l'ARN, ce dernier servant alors de transporteur s'il permet au PNA de se fixer.

Dans la **troisième étude**, conduite en parallèle de la précédente, nous avons cherché à mettre au point un dérivé des PNA qui permettrait d'avoir une efficacité augmentée. Pour la première fois, nous avons montré qu'un **dérivé** cyclique de PNA pouvait avoir une action inhibitrice sur la traduction IRES-dépendante du VHC. Bien que les résultats soient décevants en termes d'activité en comparaison avec un analogue linéaire, cela ne remet pas en cause le rationnel de l'étude. En effet, la réalisation de couplages avec des peptides augmentant la pénétration en cellules est intéressante mais conduit à un allongement important du PNA, ce qui va à l'encontre d'un objectif de baisse de la masse moléculaire du composé. La possibilité de rendre des PNA cycliques pourrait permettre dans le futur de conjuguer les excellentes propriétés des PNA avec un mode d'action de type boucle-boucle, le tout en diminuant encore la taille du composé et en pouvant apporter des modifications sur le cycle qui permettraient d'augmenter la pénétration en cellules.

Les résultats présentés dans cette étude, bien que très préliminaires, ouvrent de nouvelles perspectives mais devront être confirmées par de nouvelles synthèses qui prendront en compte les observations réalisées dans les études 2 et 3.



Au niveau des perspectives de ce travail, il convient d'envisager séparément l'étude 1 et les études 2 et 3.

Depuis la réalisation de l'étude 1, le concept d'utilisation de la variabilité naturelle des interférons est devenu « à la mode », avec en particulier les travaux menés par les sociétés Maxygen et Roche (voir p. 75). Leurs études ainsi que la notre ont permis d'identifier des candidats à un développement clinique. Il est très probable que dans les prochaines années des dérivés issus de ces recherches viennent enrichir la pharmacopée anti-VHC si les résultats obtenus sur le modèle réplicon soient validés dans le modèle de réplication complet du VHC.

En rapport avec notre travail mené sur les antisens (études 2 et 3), le constat est plus mitigé. L'approche antisens qui part d'une idée simple, éliminer la cause d'une maladie à sa source en ciblant l'ARNm, est en réalité une approche assez complexe. Depuis des années, les études ont montré que des résultats étaient possibles *in vitro* ou en cultures cellulaires mais que le passage en modèles animaux ou en essais cliniques s'avérait difficile. Avec les premières générations de molécules antisens, c'est à des problèmes d'efficacité essentiellement qu'ont dû répondre les chimistes. Aujourd'hui, avec le développement de nombreuses approches alternatives, ce paramètre a été considérablement amélioré. Le développement de molécules comme les PNA qui permettent d'obtenir des inhibitions solides et spécifiques et d'autres approches sont prometteuses. Cependant, une limitation freine toujours l'application de cette stratégie : le **problème de la pénétration des molécules dans les cellules**.

En rapport avec le VHC, il est toutefois nécessaire aujourd'hui d'anticiper l'avenir. En effet, si l'expérience des traitements à base d'antiviraux contre le VIH ou le VHB a montré que ces molécules étaient efficaces, elle montre également que ces traitements ne sont pas suffisants pour éliminer le virus (même si les problématiques sont différentes entre le VHC, VIH ou le VHB) et surtout entraînent l'apparition de mutants qui seront un nouveau défi à relever dans le futur. Une approche alternative est donc nécessaire et l'approche antisens à base de molécules robustes de type PNA fait partie des options envisageables en dépit des difficultés rencontrées aujourd'hui. Gageons que l'enjeu de santé publique que représente le VHC mais également le VIH, le VHB ou les cancers permettra de réaliser des avancées significatives dans le domaine. Le développement spectaculaire des recherches sur les siRNA et les applications qui devraient suivre pousse à l'optimisme. La découverte d'une méthode facilitant la pénétration des molécules dans les cellules pourrait « changer la donne ».

Références bibliographiques

- Adinolfi, L.E., Utili, R., Andreana, A., Tripodi, M.F., Rosario, P., Mormone, G., Ragone, E., Pasquale, G. and Ruggiero, G. (2000) Relationship between genotypes of hepatitis C virus and histopathological manifestations in chronic hepatitis C patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **12**, 299-304.
- Adlerz, L., Soomets, U., Holmlund, L., Viirlaid, S., Langel, U. and Iverfeldt, K. (2003) Down-regulation of amyloid precursor protein by peptide nucleic acid oligomer in cultured rat primary neurons and astrocytes. *Neurosci Lett*, **336**, 55-59.
- Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. and Zhang, Q.X. (1999) Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 12766-12771.
- Agrawal, S., Jiang, Z., Zhao, Q., Shaw, D., Cai, Q., Roskey, A., Channavajjala, L., Saxinger, C. and Zhang, R. (1997) Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2620-2625.
- Agrawal, S. and Kandimalla, E.R. (2000) Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today*, **6**, 72-81.
- Agrawal, S., Tamsamani, J., Galbraith, W. and Tang, J. (1995) Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Clin Pharmacokinet*, **28**, 7-16.
- Agrawal, S. and Zhang, R. (1997) Pharmacokinetics of oligonucleotides. *Ciba Found Symp*, **209**, 60-75; discussion 75-68.
- Agrawal, S. and Zhao, Q. (1998) Antisense therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, **2**, 519-528.
- Airoidi, J. and Berghella, V. (2006) Hepatitis C and pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*, **61**, 666-672.
- Akhtar, S., Kole, R. and Juliano, R.L. (1991) Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci*, **49**, 1793-1801.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Alberti, A., Chemello, L. and Benvegna, L. (1999) Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*, **31 Suppl 1**, 17-24.
- Aldaz-Carroll, L., Tallet, B., Dausse, E., Yurchenko, L. and Toulme, J.J. (2002) Apical loop-internal loop interactions: a new RNA-RNA recognition motif identified through in vitro selection against RNA hairpins of the hepatitis C virus mRNA. *Biochemistry*, **41**, 5883-5893.
- Ali, N. and Siddiqui, A. (1995) Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation. *J Virol*, **69**, 6367-6375.
- Ali, N. and Siddiqui, A. (1997) The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2249-2254.
- Alt, M., Eisenhardt, S., Serwe, M., Renz, R., Engels, J.W. and Caselmann, W.H. (1999a) Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *European Journal of Clinical Investigation*, **29**, 868-876.
- Alt, M., Eisenhardt, S., Serwe, M., Renz, R., Engels, J.W. and Caselmann, W.H. (1999b) Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides on hepatitis C virus translation. *Eur J Clin Invest*, **29**, 868-876.
- Alt, M., Renz, R., Hofschneider, P.H. and Caselmann, W.H. (1997) Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch Virol*, **142**, 589-599.
- Alt, M., Renz, R., Hofschneider, P.H., Paumgartner, G. and Caselmann, W.H. (1995) Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology*, **22**, 707-717.
- Alter, H.J., Purcell, R.H., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L. and Kuo, G. (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med*, **321**, 1494-1500.
- Alter, H.J. and Seeff, L.B. (2000) Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis*, **20**, 17-35.
- Appel, N., Pietschmann, T. and Bartenschlager, R. (2004) Mutational Analysis of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A: Potential Role of Differential Phosphorylation in RNA Replication and Identification of a Genetically Flexible Domain. American Society for Microbiology.
- Armstrong, G.L., Wasley, A., Simard, E.P., McQuillan, G.M., Kuhnert, W.L. and Alter, M.J. (2006) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med*, **144**, 705-714.
- Bain, V.G., Kaita, K.D., Yoshida, E.M., Swain, M.G., Heathcote, E.J., Neumann, A.U., Fiscella, M., Yu, R., Osborn, B.L. and Cronin, P.W. (2006) A phase 2 study to evaluate the antiviral activity, safety, and pharmacokinetics of

- recombinant human albumin-interferon alfa fusion protein in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, **44**, 671-678.
- Baker, B.F. and Monia, B.P. (1999) Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 3-18.
- Balan, V. (2003) Molecular profiles of drug response in HCV infected patients during the first four weeks of therapy for chronic hepatitis C virus with pegylated interferon containing regimens or Albuferon. *54th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.*, Boston, USA.
- Barnard, D. (2002) Viramidine (Ribapharm). *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 1585-1589.
- Bartenschlager, R. (2002) Hepatitis C virus replicons: potential role for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov*, **1**, 911-916.
- Bartenschlager, R. (2005) The hepatitis C virus replicon system: from basic research to clinical application. *J Hepatol*, **43**, 210-216.
- Barth, H., Ulsenheimer, A., Pape, G.R., Diepolder, H.M., Hoffmann, M., Neumann-Haefelin, C., Thimme, R., Henneke, P., Klein, R. and Paranhos-Baccala, G. (2005) Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. *Blood*, **105**, 3605-3614.
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.L. and Purcell, R.H. (2003a) In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14199-14204.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.L. (2003b) Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes. *Journal of Experimental Medicine*, **197**, 633-642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. and Cosset, F.L. (2003c) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem*, **278**, 41624-41630.
- Bass, B.L. (2000) Double-Stranded RNA as a Template for Gene Silencing. *Cell*, **101**, 235-238.
- Bassett, S.E. (2001) Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection. *Hepatology*, **33**, 1479-1487.
- Basu, A., Meyer, K., Ray, R.B. and Ray, R. (2002) Hepatitis C virus core protein is necessary for the maintenance of immortalized human hepatocytes. *Virology*, **298**, 53-62.
- Beames, B., Chavez, D., Guerra, B., Notvall, L., Brasky, K.M. and Lanford, R.E. (2000) Development of a Primary Tamarin Hepatocyte Culture System for GB Virus-B: a Surrogate Model for Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, **74**, 11764-11772.
- Beames, B., Chavez, D. and Lanford, R.E. (2001) GB virus B as a model for hepatitis C virus. *ILAR J*, **42**, 152-160.
- Beaudry, A., DeFoe, J., Zinnen, S., Burgin, A. and Beigelman, L. (2000) In vitro selection of a novel nuclease-resistant RNA phosphodiesterase. *Chem. Biol.*, **7**, 323-334.
- Beaulieu, P.L. and Tsantrizos, Y.S. (2004) Inhibitors of the HCV NS5B polymerase: new hope for the treatment of hepatitis C infections. *Curr Opin Investig Drugs*, **5**, 838-850.
- Beaurain, F., Di Primo, C., Toulme, J.J. and Laguerre, M. (2003) Molecular dynamics reveals the stabilizing role of loop closing residues in kissing interactions: comparison between TAR-TAR* and TAR-aptamer. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4275-4284.
- Beck, F. (2002) Solid phase synthesis of PNA oligomers. *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **208**, 29-41.
- Beck, J. and Nassal, M. (1995) Efficient hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the structured hepatitis B virus encapsidation signal in vitro and in cell extracts, but not in intact cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4954-4962.
- Behrens, S.E., Tomei, L. and De Francesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J*, **15**, 12-22.
- Bellecave, P., Andreola, M.L., Ventura, M., Tarrago-Litvak, L., Litvak, S. and Astier-Gin, T. (2003) Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides*, **13**, 455-463.
- Bendifallah, N., Kristensen, E., Dahl, O., Koppelhus, U. and Nielsen, P.E. (2003) Synthesis and properties of ester-linked peptide nucleic acid prodrug conjugates. *Bioconjug Chem*, **14**, 588-592.
- Benhamou, Y., Pockros, P., Rodriguez-Torres, M., Gordon, S., Shiffman, M., Lurie, Y., Afdahl, N., Kim, Y., Lamon, K. and Murphy, B. (2006) The safety and efficacy of Viramidine plus PegIFN alfa2b versus Ribavirin plus PegIFN alfa-2b in therapy-naïve patients infected with HCV: phase 3 results (VISER1). *41st annual meeting of the European Association for the Study of the Liver*, Vienna, Austria.
- Bennasser, Y., Le, S.Y., Benkirane, M. and Jeang, K.T. (2005) Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity*, **22**, 607-619.

- Bennett, C.F., Chiang, M.Y., Chan, H., Shoemaker, J.E. and Mirabelli, C.K. (1992) Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, **41**, 1023-1033.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, **430**, 257-263.
- Biron, C.A. and Sen, G.C. (2001) Interferons and other cytokines. *Fields Virology*, **4**, 321-351.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. and Rouille, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, **80**, 6964-6972.
- Blight, K.J., Kolykhalov, A.A. and Rice, C.M. (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, **290**, 1972-1974.
- Blight, K.J., McKeating, J.A., Marcotrigiano, J. and Rice, C.M. (2003) Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol*, **77**, 3181-3190.
- Blyn, L.B., Swiderek, K.M., Richards, O., Stahl, D.C., Semler, B.L. and Ehrenfeld, E. (1996) Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11115-11120.
- Blyn, L.B., Towner, J.S., Semler, B.L. and Ehrenfeld, E. (1997) Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol*, **71**, 6243-6246.
- Bonham, M.A., Brown, S., Boyd, A.L., Brown, P.H., Bruckenstein, D.A., Hanvey, J.C., Thomson, S.A., Pipe, A., Hassman, F., Bisi, J.E. and et al. (1995a) An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1197-1203.
- Bonham, M.A., Brown, S., Boyd, A.L., Brown, P.H., Bruckenstein, D.A., Hanvey, J.C., Thomson, S.A., Pipe, A., Hassman, F., Bisi, J.E., Froehler, B.C., Matteucci, M.D., Wagner, R.W., Noble, S.A. and Babiss, L.E. (1995b) An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Research*, **23**, 1197-1203.
- Boni, S., Lavergne, J.P., Boulant, S. and Cahour, A. (2005) Hepatitis C virus core protein acts as a trans-modulating factor on internal translation initiation of the viral RNA. *J Biol Chem*, **280**, 17737-17748.
- Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourenco, L. and Vagner, S. (2003) IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res*, **31**, 427-428.
- Borowski, P., Heiland, M., Feucht, H. and Laufs, R. (1999) Characterisation of non-structural protein 3 of hepatitis C virus as modulator of protein phosphorylation mediated by PKA and PKC: evidences for action on the level of substrate and enzyme. *Archives of Virology*, **144**, 687-701.
- Borowski, P., Niebuhr, A., Schmitz, H., Hosmane, R.S., Bretner, M., Siwecka, M.A. and Kulikowski, T. (2002a) NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochim Pol*, **49**, 597-614.
- Borowski, P., Schalinski, S. and Schmitz, H. (2002b) Nucleotide triphosphatase/helicase of hepatitis C virus as a target for antiviral therapy. *Antiviral Res*, **55**, 397-412.
- Boules, M., Williams, K., Gollatz, E., Fauq, A. and Richelson, E. (2004) Down-regulation of amyloid precursor protein by peptide nucleic acid in vivo. *J Mol Neurosci*, **24**, 123-128.
- Bowen, D.G. and Walker, C.M. (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, **436**, 946-952.
- Branch, A.D. (1998) A good antisense molecule is hard to find. *Trends Biochem Sci*, **23**, 45-50.
- Branch, A.D., Stump, D.D., Gutierrez, J.A., Eng, F. and Walewski, J.L. (2005) The Hepatitis C Virus Alternate Reading Frame(ARF) and Its Family of Novel Products: The Alternate Reading Frame Protein/F-Protein, the Double-Frameshift Protein, and Others. *Seminars in Liver Disease*, **25**, 105-117.
- Branda, R.F., Moore, A.L., Mathews, L., McCormack, J.J. and Zon, G. (1993) Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1. *Biochem Pharmacol*, **45**, 2037-2043.
- Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L. and Sonenberg, N. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle. *J Virol*, **77**, 3939-3949.
- Breaker, R.R. (2004) Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology. *Nature*, **432**, 838-845.
- Brideau-Andersen, A., Huang, X., Sun, S.-C.C., Chen, T., Stark, D., Sas, I., Zadik, L., Dawes, G., Guptill, D., Yang, S., Hong Chen, Y., Jorgen Skartved, N., Nissen, T., Foster, G.R., Symons, J., Viswanathanand, S. and Patten, P.A. (2006) Directed Evolution of Novel Gene Shuffled Interferon Alphas for the Treatment of Hepatitis C. *41th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver*, Vienna, Austria.
- Brocard, M., Paulous, S., Komarova, A.V., Deveaux, V. and Kean, K.M. (2006) Evidence that PTB does not stimulate HCV IRES-driven translation. *Virus Genes*.

- Brown-Driver, V., Eto, T., Lesnik, E., Anderson, K.P. and Hanecak, R.C. (1999) Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2[prime]-modified antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **9**, 145-154.
- Brown, S.C., Thomson, S.A., Veal, J.M. and Davis, D.G. (1994) NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science*, **265**, 777-780.
- Brunel, C., Marquet, R., Romby, P. and Ehresmann, C. (2002) RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie*, **84**, 925-944.
- Brunelle, M.N., Jacquard, A.C., Pichoud, C., Durantel, D., Carrouee-Durantel, S., Villeneuve, J.P., Trepo, C. and Zoulim, F. (2005) Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology*, **41**, 1391-1398.
- Buckwold, V.E., Beer, B.E. and Donis, R.O. (2003) Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res*, **60**, 1-15.
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R.E., Govindarajan, S., Shapiro, M., St Claire, M. and Bartenschlager, R. (2002) Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14416-14421.
- Bukh, J. and Purcell, R.H. (2006) A milestone for hepatitis C virus research: A virus generated in cell culture is fully viable in vivo See companion article on page 3805. © 2006 by The National Academy of Sciences of the USA.
- Caldarelli, S.A., Mehiri, M., Di Giorgio, A., Martin, A., Hantz, O., Zoulim, F., Terreux, R., Condom, R. and Patino, N. (2005) A cyclic PNA-based compound targeting domain IV of HCV IRES RNA inhibits in vitro IRES-dependent translation. *Bioorg Med Chem*, **13**, 5700-5709.
- Campbell, J.M., Bacon, T.A. and Wickstrom, E. (1990) Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods*, **20**, 259-267.
- Carmichael, G.G. (2002) Medicine Silencing viruses with RNA. *Nature*, **418**, 379-380.
- Carroll, S.S. and Olsen, D.B. (2004) Nucleoside Analog Inhibitors of Hepatitis C Virus Replication. *Antiviral Res*, **62**, A83.
- Castet, V., Fournier, C., Soulier, A., Brillet, R., Coste, J., Larrey, D., Dhumeaux, D., Maurel, P. and Pawlotsky, J.-M. (2002) Alpha Interferon Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Primary Human Hepatocytes Infected In Vitro. *J. Virol.*, **76**, 8189-8199.
- Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, **16**, 2491-2496.
- Cavalli-Sforza, L.L., Menozzi, P. and Piazza, A. (1994) *The History and Geography of Human Genes*. Princeton University Press.
- Cech, T.R., Zaug, A.J. and Grabowski, P.J. (1981) In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*, **27**, 487-496.
- Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B. and de Franciscis, V. (2002) Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett*, **528**, 12-16.
- Chakraborti, S. and Banerjee, A.C. (2003) Inhibition of HIV-1 gene expression by novel DNA enzymes targeted to cleave HIV-1 TAR RNA: potential effectiveness against all HIV-1 isolates. *Mol Ther*, **7**, 817-826.
- Chan, L., Pereira, O., Reddy, T.J., Das, S.K., Poisson, C., Courchesne, M., Proulx, M., Siddiqui, A., Yannopoulos, C.G., Nguyen-Ba, N., Roy, C., Nasturica, D., Moinet, C., Bethell, R., Hamel, M., L'Heureux, L., David, M., Nicolas, O., Courtemanche-Asselin, P., Brunette, S., Bilimoria, D. and Bedard, J. (2004) Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 2: tertiary amides. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 797-800.
- Chang, C.C., Chen, T.T., Cox, B.W., Dawes, G.N., Stemmer, W.P., Punnonen, J. and Patten, P.A. (1999) Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat Biotechnol*, **17**, 793-797.
- Chapel, C., Garcia, C., Roingard, P., Zitzmann, N., Dubuisson, J., Dwek, R.A., Trepo, C., Zoulim, F. and Durantel, D. (2006a) Antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J Gen Virol*, **87**, 861-871.
- Chapel, C., Zitzmann, N., Zoulim, F. and Durantel, D. (2006b) Virus morphogenesis and viral entry as alternative targets for novel hepatitis C antivirals. *Future Virology*, **1**, 197-209.
- Chaubey, B., Tripathi, S., Ganguly, S., Harris, D., Casale, R.A. and Pandey, V.N. (2005) A PNA-transportan conjugate targeted to the TAR region of the HIV-1 genome exhibits both antiviral and virucidal properties. *Virology*, **331**, 418-428.
- Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L.L., Coltescu, C., Heathcote, J., Edwards, A.M. and McGilvray, I.D. (2005) Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*, **128**, 1437-1444.

- Chen, S.L. and Morgan, T.R. (2006) The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*, **3**, 47-52.
- Cheney, I.W., Lai, V.C., Zhong, W., Brodhag, T., Dempsey, S., Lim, C., Hong, Z., Lau, J.Y. and Tam, R.C. (2002) Comparative analysis of anti-hepatitis C virus activity and gene expression mediated by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol*, **76**, 11148-11154.
- Chiarantini, L., Cerasi, A., Fraternali, A., Millo, E., Benatti, U., Sparnacci, K., Laus, M., Ballestri, M. and Tondelli, L. (2005) Comparison of novel delivery systems for antisense peptide nucleic acids. *J Control Release*, **109**, 24-36.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359-362.
- Collier, A.J., Tang, S. and Elliott, R.M. (1998) Translation efficiencies of the 5'untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system. *Journal of General Virology*, **79**, 2359-2366.
- Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y.J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, **5**, 1219-1226.
- Condra, J.H., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Quintero, J., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E. and Shivaprakash, M. (2002) In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*, **374**, 569-571.
- Conry-Cantilena, C., VanRaden, M., Gible, J., Melpolder, J., Shakil, A.O., Viladomiu, L., Cheung, L., DiBisceglie, A., Hoofnagle, J., Shih, J.W. and et al. (1996) Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **334**, 1691-1696.
- Contreras, A.M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E.V. and Chung, R.T. (2002) Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol*, **76**, 8505-8517.
- Cornberg, M., Hadem, J., Herrmann, E., Schuppert, F., Schmidt, H.H., Reiser, M., Marschal, O., Steffen, M., Manns, M.P. and Wedemeyer, H. (2006) Treatment with daily consensus interferon (CIFN) plus ribavirin in non-responder patients with chronic hepatitis C: a randomized open-label pilot study. *J Hepatol*, **44**, 291-301.
- Couzin, J. (2002) BREAKTHROUGH OF THE YEAR: Small RNAs Make Big Splash. *Science*, **298**, 2296-2297.
- Cox, J.C. (2002a) Automated acquisition of aptamer sequences. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **4**, 289-299.
- Cox, J.C. (2002b) Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e108-e108.
- Cox, J.C. and Ellington, A.D. (2001) Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2525-2531.
- Cramp, M.E., Rossol, S., Chokshi, S., Carucci, P., Williams, R. and Naoumov, N.V. (2000) Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **118**, 346-355.
- Craxi, A. (2006) Improvement in the offing with new interferons and ribavirins. *12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, Paris, France.
- Creancier, L., Morello, D., Mercier, P. and Prats, A.C. (2000) Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol*, **150**, 275-281.
- Cribier, B., Rey, D., Schmitt, C., Lang, J.M., Kirn, A. and Stoll-Keller, F. (1995) High hepatitis C viraemia and impaired antibody response in patients coinfecting with HIV. *Aids*, **9**, 1131-1136.
- Crooke, R.M., Graham, M.J., Cooke, M.E. and Crooke, S.T. (1995) In vitro pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 462-473.
- Crooke, S.T. (1993) Progress toward oligonucleotide therapeutics: pharmacodynamic properties. *Faseb J*, **7**, 533-539.
- Crooke, S.T. (1996) Progress in antisense therapeutics. *Med Res Rev*, **16**, 319-344.
- Crooke, S.T. (1999) Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta*, **1489**, 31-44.
- Crooke, S.T. (2004) Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, **55**, 61-95.
- Crooke, S.T., Graham, M.J., Zuckerman, J.E., Brooks, D., Conklin, B.S., Cummins, L.L., Greig, M.J., Guinosso, C.J., Kornbrust, D., Manoharan, M., Sasmor, H.M., Schleich, T., Tivel, K.L. and Griffey, R.H. (1996) Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **277**, 923-937.
- Crotty, S., Cameron, C.E. and Andino, R. (2001) RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 6895-6900.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J.J., Zhong, W., Lau, J.Y.N., Hong, Z., Andino, R. and Cameron, C.E. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine*, **6**, 1375-1379.
- Da Rocha Gomes, S., Dausse, E. and Toulme, J.J. (2004) Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 820-826.
- De Clercq, E. (2001a) Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology*, **22**, 73-89.

- De Clercq, E. (2001b) Molecular targets for antiviral agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **297**, 1-10.
- De Clercq, E., Eckstein, F., Sternbach, H. and Merigan, T.C. (1969) Interferon induction by and ribonuclease sensitivity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides. *Antimicrobial Agents Chemother (Bethesda)*, **9**, 187-191.
- De Francesco, R. and Migliaccio, G. (2005) Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature*, **436**, 953-960.
- De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V. and Migliaccio, G. (2003) Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Research*, **58**, 1-16.
- Delhem, N., Sabile, A., Gajardo, R., Podevin, P., Abadie, A., Blaton, M.A., Kremersdorf, D., Beretta, L. and Brechot, C. (2001) Activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Hepatocellular carcinoma derived-Hepatitis C virus core protein.
- Demidov, V.V., Potaman, V.N., Frank-Kamenetskii, M.D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S.H. and Nielsen, P.E. (1994) Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol*, **48**, 1310-1313.
- Deng, Q., German, I., Buchanan, D. and Kennedy, R.T. (2001) Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal. Chem.*, **73**, 5415-5421.
- Depecker, G., Patino, N., Di Giorgio, C., Terreux, R., Cabrol-Bass, D., Bailly, C., Aubertin, A.M. and Condom, R. (2004) Cyclic PNA-based compound directed against HIV-1 TAR RNA: modelling, liquid-phase synthesis and TAR binding. *Org Biomol Chem*, **2**, 74-79.
- Desenclos, J.C. (2003) L 'infection par le virus de l 'hépatite C dans le monde: importance en santé publique, modes de transmission et perspectives. *Virologie*, **3**, 177-191.
- Desenclos, J.C., Dubois, F., Couturier, E., Pillonel, J., Roudot-Thoraval, F., Guignard, E., Brunet, J.B. and Drucker, J. (1996) Estimation du nombre de sujets infectés par le VHC en France, 1994-1995. *BEH*, **5**, 22-23.
- Di Marco, S., Volpari, C., Tomei, L., Altamura, S., Harper, S., Narjes, F., Koch, U., Rowley, M., De Francesco, R. and Migliaccio, G. (2005) Interdomain Communication in Hepatitis C Virus Polymerase Abolished by Small Molecule Inhibitors Bound to a Novel Allosteric Site. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 29765-29770.
- Dias, N., Senamaud-Beaufort, C., Forestier, E.I., Auvin, C., Helene, C. and Ester Saison-Behmoaras, T. (2002) RNA Hairpin Invasion and Ribosome Elongation Arrest by Mixed Base PNA Oligomer. *Journal of Molecular Biology*, **320**, 489-501.
- Dixit, N.M., Layden-Almer, J.E., Layden, T.J. and Perelson, A.S. (2004) Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. *Nature*, **432**, 922-924.
- Domingo, E. (1998) Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clin Diagn Virol*, **10**, 97-101.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J. and Arias, A. (2006) Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, **299**, 51-82.
- Donahue, J.G., Munoz, A., Ness, P.M., Brown, D.E., Jr., Yawn, D.H., McAllister, H.A., Jr., Reitz, B.A. and Nelson, K.E. (1992) The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **327**, 369-373.
- Dorsett, Y. and Tuschl, T. (2004) siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 318-329.
- Doyle, D.F., Braasch, D.A., Simmons, C.G., Janowski, B.A. and Corey, D.R. (2001) Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry*, **40**, 53-64.
- Duarte, E.A., Novella, I.S., Weaver, S.C., Domingo, E., Wain-Hobson, S., Clarke, D.K., Moya, A., Elena, S.F., de la Torre, J.C. and Holland, J.J. (1994) RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infect Agents Dis*, **3**, 201-214.
- Dubois, F., Desenclos, J.C., Mariotte, N. and Goudeau, A. (1997) Hepatitis C in a French population-based survey, 1994: seroprevalence, frequency of viremia, genotype distribution, and risk factors. The Collaborative Study Group. *Hepatology*, **25**, 1490-1496.
- Duconge, F. and Toulme, J.J. (1999) In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *Rna*, **5**, 1605-1614.
- Dueholm, K.L., Egholm, M., Behrens, C., Christensen, L., Hansen, H.F., Vulpius, T., Petersen, K.H., Berg, R.H., Nielsen, P.E. and Buchardt, O. (1994) Synthesis of peptide nucleic acid monomers containing the four natural nucleobases: Thymine, cytosine, adenine, and guanine and their oligomerization. *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 5767-5773.

- Dutartre, H., Bussetta, C., Boretto, J. and Canard, B. (2006) General catalytic deficiency of hepatitis C virus RNA polymerase with an S282T mutation and mutually exclusive resistance towards 2'-modified nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 4161-4169.
- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D. and Bienz, K. (2002) Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*, **76**, 5974-5984.
- Eguchi, Y. and Tomizawa, J. (1990) Complex formed by complementary RNA stem-loops and its stabilization by a protein: function of CoIE1 Rom protein. *Cell*, **60**, 199-209.
- Ekker, S.C. and Larson, J.D. (2001) Morphant technology in model developmental systems. *Genesis*, **30**, 89-93.
- Emmanuelli, J. (2002) Epidémiologie du VHC et des infections transmissibles associées chez les usagers de drogue. *Rencontre Nationale des Acteurs de Santé*.
- Encke, J., zu Putlitz, J., Stremmel, W. and Wands, J.R. (2003) CpG immuno-stimulatory motifs enhance humoral immune responses against hepatitis C virus core protein after DNA-based immunization. *Archives of Virology*, **148**, 435-448.
- Ennifar, E., Walter, P., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Dumas, P. (2001) Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol*, **8**, 1064-1068.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F. and Sato, C. (1995) Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest*, **96**, 224-230.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F. and Sato, C. (1996) Mutations in the Nonstructural Protein 5a Gene and Response to Interferon in Patients with Chronic Hepatitis C Virus 1b Infection.
- Escuret, V., Parvaz, P., Hantz, O., Petit, M.A., Trepo, C. and Zoulim, F. (2002) Study of the antiviral mechanism of action of ribavirin in the bovine viral diarrhea virus model. *Gastroenterol Clin Biol*, **26**, 584-590.
- Famulok, M. and Verma, S. (2002) In vivo-applied functional RNAs as tools in proteomics and genomics research. *Trends Biotechnol.*, **20**, 462-466.
- Fang, J.W., Chow, V. and Lau, J.Y. (1997) Virology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*, **1**, 493-514, v.
- Faq, C. and Zone, R. (2006) The polymerase inhibitor R 1626 is effective in patients with chronic hepatitis C. *Inpharma*, **1**, 6-6.
- Farci, P. and Purcell, R.H. (2000) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin. Liv. Dis.*, **20**, 103-126.
- Farci, P., Strazzer, R., Alter, H.J., Farci, S., Degioannis, D., Coiana, A., Peddis, G., Usai, F., Serra, G. and Chessa, L. (2002) Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 3081-3086.
- Faruqi, A.F., Egholm, M. and Glazer, P.M. (1998) Peptide nucleic acid-targeted mutagenesis of a chromosomal gene in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1398-1403.
- Feld, J.J. and Hoofnagle, J.H. (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, **436**, 967-972.
- Fernandez-Larsson, R. and Patterson, J.L. (1990) Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Molecular Pharmacology*, **38**, 766-770.
- Ferron, F., Bussetta, C., Dutartre, H. and Canard, B. (2005) The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. *BMC Bioinformatics*, **6**, 255.
- Filipovska, A., Eccles, M.R., Smith, R.A. and Murphy, M.P. (2004) Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation. *FEBS Lett*, **556**, 180-186.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fischer, R., Fotin-Mleczek, M., Hufnagel, H. and Brock, R. (2005) Break on through to the Other Side—Biophysics and Cell Biology Shed Light on Cell-Penetrating Peptides. *ChemBiochem*, **6**, 2126-2142.
- Flierl, A., Jackson, C., Cottrell, B., Murdock, D., Seibel, P. and Wallace, D.C. (2003) Targeted delivery of DNA to the mitochondrial compartment via import sequence-conjugated peptide nucleic acid. *Mol Ther*, **7**, 550-557.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S. and McKeating, J.A. (1999) Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor, CD81. *Journal of Virology*, **73**, 6235-6244.

- Florese, R.H., Nagano-Fujii, M., Iwanaga, Y., Hidajat, R. and Hotta, H. (2002) Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res*, **90**, 119-131.
- Folgori, A., Capone, S., Ruggeri, L., Meola, A., Sporeno, E., Ercole, B.B., Pezzanera, M., Tafi, R., Arcuri, M. and Fattori, E. (2006) A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nature Medicine*, **12**, 190-197.
- Folini, M., Berg, K., Millo, E., Villa, R., Prasmickaite, L., Daidone, M.G., Benatti, U. and Zaffaroni, N. (2003) Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. *Cancer Research*, **63**, 3490-3494.
- Foutrein, P., Lucidarme, D., Muysen, A., Vandermolen, P., Danel, T., Bailly, B. and Filoche, B. (1993) Prévalence des hépatites B et C et du VIH dans une population de toxicomanes intraveineux de l'agglomération lilloise. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **17**, A282.
- Foy, E., Li, K., Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Johnson, C.L., Wang, C., Fish, P.M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2005) Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2986-2991.
- Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E.S., Anwar, W. and Sallam, I. (2000) The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, **355**, 887-891.
- Freier, S. (1993) Hybridization considerations affecting antisense drugs. In Press, C. (ed.), *Antisense Research and Applications*, Boca Raton, Florida, USA.
- Frese, M., Pietschmann, T., Moradpour, D., Haller, O. and Bartenschlager, R. (2001) Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol*, **82**, 723-733.
- Frese, M., Schwarzle, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S., Haller, O. and Bartenschlager, R. (2002) Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*, **35**, 694-703.
- Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., Craxi, A., Lin, A., Hoffman, J. and Yu, J. (2002) Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, **347**, 975-982.
- Fukuda, K. (2000) Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3685-3694.
- Gale Jr, M.J., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R. and Katze, M.G. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, **230**, 217-227.
- Gale, M., Jr. and Foy, E.M. (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 939-945.
- Gamarnik, A.V. and Andino, R. (1997) Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *Rna*, **3**, 882-892.
- Gambari, R. (2001) Peptide-nucleic acids (PNAs): a tool for the development of gene expression modifiers. *Curr Pharm Des*, **7**, 1839-1862.
- Gao, W.Y., Han, F.S., Storm, C., Egan, W. and Cheng, Y.C. (1992) Phosphorothioate oligonucleotides are inhibitors of human DNA polymerases and RNase H: implications for antisense technology. *Mol Pharmacol*, **41**, 223-229.
- Germain, R.N. (2004) An innately interesting decade of research in immunology. *Nature Medicine*, **10**, 1307-1320.
- Ghosh, A.K., Majumder, M., Steele, R., Yaciuk, P., Chrivia, J., Ray, R. and Ray, R.B. (2000) Hepatitis C Virus NS5A Protein Modulates Transcription through a Novel Cellular Transcription Factor SRCAP. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 7184-7188.
- Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. (2002) Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, **418**, 430-434.
- Goila, R. and Banerjee, A.C. (2001) Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by novel DNA enzymes. *Biochem J*, **353**, 701-708.
- Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763-797.
- Gong, G., Waris, G., Tanveer, R. and Siddiqui, A. (2001) Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 9599-9604.
- Good, L., Awasthi, S.K., Dryselius, R., Larsson, O. and Nielsen, P.E. (2001) Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat Biotechnol*, **19**, 360-364.

- Good, L. and Nielsen, P.E. (1997) Progress in developing PNA as a gene-targeted drug. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **7**, 431-437.
- Gray, G.D., Basu, S. and Wickstrom, E. (1997) Transformed and immortalized cellular uptake of oligodeoxynucleoside phosphorothioates, 3'-Alkylamino oligodeoxynucleotides, 2'-o-methyl oligoribonucleotides, oligodeoxynucleoside methylphosphonates, and peptide nucleic acids. *Biochemical Pharmacology*, **53**, 1465-1476.
- Gray, P.W. and Goeddel, D.V. (1982) Structure of the human immune interferon gene. *NATURE (LONDON)*, **298**, 859-863.
- Guo, H.Z., Mao, Q., Li, Q.F., Wang, Y.M., Yu, L.C. and Jiang, Y.G. (2003a) Construction of the expression vectors of HDV ribozymes and their intracellular inhibiting activity against HCV RNA. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **11**, 432-435.
- Guo, J.T., Bichko, V.V. and Seeger, C. (2001) Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon. *J Virol*, **75**, 8516-8523.
- Guo, J.T., Sohn, J.A., Zhu, Q. and Seeger, C. (2004) Mechanism of the interferon alpha response against hepatitis C virus replicons. *Virology*, **325**, 71-81.
- Guo, J.T., Zhu, Q. and Seeger, C. (2003b) Cytopathic and Noncytopathic Interferon Responses in Cells Expressing Hepatitis C Virus Subgenomic Replicons. *Journal of Virology*, **77**, 10769-10779.
- Gursel, I., Gursel, M., Ishii, K.J. and Klinman, D.M. (2001) Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol*, **167**, 3324-3328.
- Hall, C.B., Walsh, E.E., Hruska, J.F., Betts, R.F. and Hall, W.J. (1983) Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection. A controlled double-blind study in young adults. *Jama*, **249**, 2666-2670.
- Haller, A.A. and Semler, B.L. (1992) Linker scanning mutagenesis of the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J Virol*, **66**, 5075-5086.
- Hamaguchi, N., Ellington, A. and Stanton, M. (2001) Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal. Biochem.*, **294**, 126-131.
- Hamers, C., Dehan, P., Couvreur, B., Letellier, C., Kerkhofs, P. and Pastoret, P.P. (2001) Diversity among bovine pestiviruses. *Vet J*, **161**, 112-122.
- Han, J.H., Shyamala, V., Richman, K.H., Brauer, M.J., Irvine, B., Urdea, M.S., Tekamp-Olson, P., Kuo, G., Choo, Q.L. and Houghton, M. (1991) Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1711-1715.
- Hanecak, R., Brown-Driver, V., Fox, M.C., Azad, R.F., Furusako, S., Nozaki, C., Ford, C., Sasmor, H. and Anderson, K.P. (1996) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J Virol*, **70**, 5203-5212.
- Hannon, G.J. and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, **431**, 371-378.
- Hanvey, J.C., Peffer, N.J., Bisi, J.E., Thomson, S.A., Cadilla, R., Josey, J.A., Ricca, D.J., Hassman, C.F., Bonham, M.A., Au, K.G. and et al. (1992) Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*, **258**, 1481-1485.
- Harayama, S. (1998) Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol*, **16**, 76-82.
- Hauri, A.M., Armstrong, G.L. and Hutin, Y.J.F. (2004) The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International Journal Of STD & AIDS*, **15**, 7-16.
- Hayashi, J., Stoyanova, R. and Seeger, C. (2005) The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology*, **335**, 264-275.
- Hayashi, S., Nishimura, K., Fukuchi-Shimogori, T., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. (2000) Increase in cap- and IRES-dependent protein synthesis by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 117-123.
- Hazuda, D.J., Fetock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C. and Miller, M.D. (2000) Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science*, **287**, 646-650.
- Heintges, T., Encke, J., zu Putlitz, J. and Wands, J.R. (2001) Inhibition of hepatitis C virus NS3 function by antisense oligodeoxynucleotides and protease inhibitor. *J Med Virol*, **65**, 671-680.
- Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W. and Kunz, C. (1994) Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*, **198**, 109-117.

- Hellen, C.U. and Sarnow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev*, **15**, 1593-1612.
- Hellen, C.U., Witherell, G.W., Schmid, M., Shin, S.H., Pestova, T.V., Gil, A. and Wimmer, E. (1993) A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7642-7646.
- Henry, S.P., Monteith, D. and Levin, A.A. (1997) Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 2. Toxicological properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Anticancer Drug Des*, **12**, 395-408.
- Hermann, T. and Patel, D.J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, **287**, 820-825.
- HGS. (2006) HUMAN GENOME SCIENCES ANNOUNCES PHASE 3 CLINICAL DEVELOPMENT PROGRAM FOR ALBUFERON™ IN CHRONIC HEPATITIS C Human Genome Sciences, ROCKVILLE.
- Hijikata, M., Shimizu, Y.K., Kato, H., Iwamoto, A., Shih, J.W., Alter, H.J., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1993) Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes. *J Virol*, **67**, 1953-1958.
- Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Wedemeyer, H., Reiser, M., Sentjens, R.E., Calleja, J.L., Forn, X., Erhardt, A., Cronlein, J. and Chaves, R.L. (2004) Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology*, **127**, 1347-1355.
- Hoffman, M.A. and Palmenberg, A.C. (1996) Revertant analysis of J-K mutations in the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site detects an altered leader protein. *J Virol*, **70**, 6425-6430.
- Hoke, G.D., Draper, K., Freier, S.M., Gonzalez, C., Driver, V.B., Zounes, M.C. and Ecker, D.J. (1991) Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5743-5748.
- Homann, M. and Goring, H.U. (2001) Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggests therapeutic 'piggy-back' approach. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2571-2580.
- Honda, M., Beard, M.R., Ping, L.H. and Lemon, S.M. (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol*, **73**, 1165-1174.
- Honda, M., Brown, E.A. and Lemon, S.M. (1996) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *Rna*, **2**, 955-968.
- Honda, M., Kaneko, S., Matsushita, E., Kobayashi, K., Abell, G.A. and Lemon, S.M. (2000) Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology*, **118**, 152-162.
- Hoofnagle, J.H. (1986) Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human [alpha]-interferon. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, **315**, 1575-1578.
- Houghton, M. and Abrignani, S. (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 961-966.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M.C., Prats, A.C. and Prats, H. (1998) Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol*, **18**, 6178-6190.
- Hutin, Y.J.F. and Chen, R.T. (1999) Injection safety: A global challenge. *Bulletin of the World Health Organization*, **77**, 787-788.
- Hwang, B., Cho, J.S., Yeo, H.J., Kim, J.H., Chung, K.M., Han, K., Jang, S.K. and Lee, S.W. (2004) Isolation of specific and high-affinity RNA aptamers against NS3 helicase domain of hepatitis C virus. *Rna*, **10**, 1277-1290.
- Hwang, J., Fauzi, H., Fukuda, K., Sekiya, S., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Taira, K., Kusakabe, I. and Nishikawa, S. (2000a) The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 557-562.
- Hwang, J., Fauzi, H., Fukuda, K., Sekiya, S., Kakiuchi, N., Taira, K., Kusakabe, I. and Nishikawa, S. (2000b) Analysis of aptamer binding site for HCV-NS3 protease by alanine scanning mutagenesis. *Nucleic Acids Symp Ser*, 253-254.
- Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M.B., Macioce, G., Hassan, H.J., Ponzetto, A., Clement, M., Peschle, C. and Carloni, G. (1997) Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology*, **26**, 1328-1337.
- Ikeda, M., Sugiyama, K., Mizutani, T., Tanaka, T., Tanaka, K., Sekihara, H., Shimotohno, K. and Kato, N. (1998) Human hepatocyte clonal cell lines that support persistent replication of hepatitis C virus. *Virus Res*, **56**, 157-167.
- Ikeda, M., Yi, M., Li, K. and Lemon, S.M. (2002) Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells. *J Virol*, **76**, 2997-3006.

- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus Interference. I. The Interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **147**, 258-267.
- Ito, T., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. and Yasui, K. (1996) Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol*, **77 (Pt 5)**, 1043-1054.
- Jackson, R.J., Hall, D.F. and Kerr, P.J. (1996) Construction of recombinant myxoma viruses expressing foreign genes from different intergenic sites without associated attenuation. *J Gen Virol*, **77 (Pt 7)**, 1569-1575.
- Jacobs, B.L. and Langland, J.O. (1996) When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, **219**, 339-349.
- Janeway Jr, C.A. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, **20**, 197-216.
- Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*, **62**, 2636-2643.
- Jauffret-Roustide, M., Couturier, E., Le Strat, Y., Barin, F., Emmanuelli, J., Semaille, C., Quaglia, M., Razafindratsima, N., Vivier, G., Oudaya, L., Lefevre, C. and Desenclos, J.-C. (2006) Estimation de la séroprévalence du VIH et du VHC et profils des usagers de drogues en France, étude InVS-ANRS Coquelicot, 2004. *BEH*, **33**.
- Jayasena, S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, **9**, 1628-1650.
- Jhaveri, S., Rajendran, M. and Ellington, A.D. (2000) In vitro selection of signaling aptamers. *Nature Biotechnol.*, **18**, 1293-1297.
- Jia, X.Y., Tesar, M., Summers, D.F. and Ehrenfeld, E. (1996) Replication of hepatitis A viruses with chimeric 5' nontranslated regions. *J Virol*, **70**, 2861-2868.
- Jiankuo, M., Xingbing, W., Baojun, H., Xiongwin, W., Zhuoya, L., Ping, X., Yong, X., Anting, L., Chunsong, H., Feili, G. and Jinquan, T. (2003) Peptide nucleic acid antisense prolongs skin allograft survival by means of blockade of CXCR3 expression directing T cells into graft. *J Immunol*, **170**, 1556-1565.
- Jiao, X., Wang, R.Y.H., Qiu, Q., Alter, H.J. and Shih, J.W.K. (2004) Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *SGM*.
- Jimenez-Garcia, L.F. (1993) Organization of the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI and virus-associated VA RNAI in adenovirus-2-infected HeLa cells.
- Joos, R.W. and Hall, W.H. (1969) Determination of binding constants of serum albumin for penicillin. *J Pharmacol Exp Ther*, **166**, 113-118.
- Kakiuchi, N., Fukuda, K., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Shimotohno, K. (2003) Inhibition of hepatitis C virus serine protease in living cells by RNA aptamers detected using fluorescent protein substrates. *Comb Chem High Throughput Screen*, **6**, 155-160.
- Kaminski, A., Hunt, S.L., Patton, J.G. and Jackson, R.J. (1995) Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *Rna*, **1**, 924-938.
- Kanazawa, Y., Ohkawa, K., Ueda, K., Mita, E., Takehara, T., Sasaki, Y., Kasahara, A. and Hayashi, N. (1996) Hammerhead Ribozyme-Mediated Inhibition of Telomerase Activity in Extracts of Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **225**, 570-576.
- Kanda, T., Steele, R., Ray, R. and Ray, R.B. (2006) Small Interfering Rna Targeted to Hepatitis C Virus 5'nontranslated Region Exerts Potent Antiviral Effect. *J Virol*.
- Kandimalla, E.R., Shaw, D.R. and Agrawal, S. (1998) Effects of phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide and oligoribonucleotides on human complement and coagulation. *Bioorg Med Chem Lett*, **8**, 2103-2108.
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A. and Chisari, F.V. (2007) Initiation of Hepatitis C Virus Infection Is Dependent on Cholesterol and Cooperativity between CD81 and Scavenger Receptor B Type I. *J. Virol.*, **81**, 374-383.
- Kaplan, D.H. (1998) Demonstration of an interferon [gamma]-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 7556-7561.
- Karkare, S. and Bhatnagar, D. (2006) Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. *Appl Microbiol Biotechnol*, **71**, 575-586.
- Karmochkine, M., Carrat, F., Dos Santos, O., Cacoub, P. and Raguin, G. (2006) A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection. *Journal of Viral Hepatitis*, **13**, 775-782.

- Karras, J.G., Maier, M.A., Lu, T., Watt, A. and Manoharan, M. (2001) Peptide nucleic acids are potent modulators of endogenous pre-mRNA splicing of the murine interleukin-5 receptor-alpha chain. *Biochemistry*, **40**, 7853-7859.
- Kashani-Sabet, M. (2002) Ribozyme therapeutics. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **7**, 76-78.
- Kato, N., Ikeda, M., Mizutani, T., Sugiyama, K., Noguchi, M., Hirohashi, S. and Shimotohno, K. (1996) Replication of hepatitis C virus in cultured non-neoplastic human hepatocytes. *Jpn J Cancer Res*, **87**, 787-792.
- Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M. and Wakita, T. (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**, 1808-1817.
- Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T. and Wakita, T. (2001) Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*, **64**, 334-339.
- Katze, M.G., He, Y. and Gale, M., Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol*, **2**, 675-687.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, **7**, 131-137.
- Keskinen, P., Nyqvist, M., Sareneva, T., Pirhonen, J., Melen, K. and Julkunen, I. (1999) Impaired antiviral response in human hepatoma cells. *Virology*, **263**, 364-375.
- Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M.G., Lau, J.Y. and Doudna, J.A. (1999) The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold. *J Mol Biol*, **292**, 513-529.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Hwang, J., Kuno, A., Hasegawa, T. and Nishikawa, S. (2003) RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 263-270.
- Kikuchi, K., Umehara, T., Fukuda, K., Kuno, A., Hasegawa, T. and Nishikawa, S. (2005) A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain III. *Nucleic Acids Res*, **33**, 683-692.
- Kim, J.L. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, **6**, 89-100.
- Kinzie, J.L., Naylor, P.H., Nathani, M.G., Peleman, R.R., Ehrinpreis, M.N., Lybik, M., Turner, J.R., Janisse, J.J., Massanari, M. and Mutchnick, M.G. (2001) African Americans with genotype 1 treated with interferon for chronic hepatitis C have a lower end of treatment response than Caucasians. *J Viral Hepat*, **8**, 264-269.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A. and Meins, F., Jr. (2002) High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11981-11986.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. and Krieg, A.M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2879-2883.
- Knudsen, H. and Nielsen, P.E. (1996a) Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Research*, **24**, 494-500.
- Knudsen, H. and Nielsen, P.E. (1996b) Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res*, **24**, 494-500.
- Knudsen, H. and Nielsen, P.E. (1997) Application of peptide nucleic acid in cancer therapy. *Anticancer Drugs*, **8**, 113-118.
- Kobayashi, M., Bennett, M.C., Bercot, T. and Singh, I.R. (2006) Functional analysis of hepatitis C virus envelope proteins, using a cell-cell fusion assay. *J Virol*, **80**, 1817-1825.
- Kolykhalov, A.A. (1997) Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, **277**, 570-574.
- Koning, G.A., Morselt, H.W., Gorter, A., Allen, T.M., Zalipsky, S., Kamps, J.A. and Scherphof, G.L. (2001) Pharmacokinetics of differently designed immunoliposome formulations in rats with or without hepatic colon cancer metastases. *Pharm Res*, **18**, 1291-1298.
- Koppelhus, U., Awasthi, S.K., Zachar, V., Holst, H.U., Ebbesen, P. and Nielsen, P.E. (2002) Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **12**, 51-63.
- Koshy, A., Madda, J.P., Marcellin, P. and Martinot, M. (2002) Treatment of hepatitis C virus genotype 4-related cirrhosis: ribavirin and interferon combination compared with interferon alone. *J Clin Gastroenterol*, **35**, 82-85.
- Kotenko, S.V., Gallagher, G., Baurin, V.V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N.K., Langer, J.A., Sheikh, F., Dickensheets, H. and Donnelly, R.P. (2003) IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*, **4**, 69-77.

- Krieger, N., Lohmann, V. and Bartenschlager, R. (2001) Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Journal of Virology*, **75**, 4614-4624.
- Kronke, J., Kittler, R., Buchholz, F., Windisch, M.P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R. and Frese, M. (2004) Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol*, **78**, 3436-3446.
- Kruger, M., Beger, C., Welch, P.J., Barber, J.R. and Wong-Staal, F. (2001) C-SPACE (cleavage-specific amplification of cDNA ends): a novel method of ribozyme-mediated gene identification. *Nucleic Acids Res*, **29**, E94.
- Kuhn, H., Demidov, V.V., Coull, J.M., Fiandaca, M.J., Gildea, B.D. and Frank-Kamenetskii, M.D. (2002) Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 1097-1103.
- Kuhn, H., Demidov, V.V., Gildea, B.D., Fiandaca, M.J., Coull, J.C. and Frank-Kamenetskii, M.D. (2001) PNA beacons for duplex DNA. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, **11**, 265-270.
- Kumagai, I., Takahashi, T., Hamasaki, K., Ueno, A. and Mihara, H. (2001) HIV Rev peptides conjugated with peptide nucleic acids and their efficient binding to RRE RNA. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 1169-1172.
- Kumar, P.K., Machida, K., Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Vishnuvardhan, D., Shimotohno, K., Taira, K. and Nishikawa, S. (1997) Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology*, **237**, 270-282.
- Kuramoto, E., Yano, O., Kimura, Y., Baba, M., Makino, T., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T. and Tokunaga, T. (1992) Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res*, **83**, 1128-1131.
- Lai, M.E., Mazzoleni, A.P., Argioli, F., De Virgili, S., Balestrieri, A., Purcell, R.H., Cao, A. and Farci, P. (1994) Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*, **343**, 388-390.
- Lamarre, D. (2003) An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, **426**, 186-189.
- Lanford, R., Sureau, C., Jacob, J., White, R. and Fuerst, T. (1994) Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR. *Virology*, **202**, 606-614.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J.Y., Hong, Z., Brasky, K.M. and Beames, B. (2001) Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol*, **75**, 8074-8081.
- Lanford, R.E., Guerra, B., Chavez, D., Bigger, C., Brasky, K.M., Wang, X.H., Ray, S.C. and Thomas, D.L. (2004) Cross-genotype immunity to hepatitis C virus. *J Virol*, **78**, 1575-1581.
- Lanford, R.E., Guerra, B., Lee, H., Averett, D.R., Pfeiffer, B., Chavez, D., Notvall, L. and Bigger, C. (2003) Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *J Virol*, **77**, 1092-1104.
- LaPlante, S.R., Jakalian, A., Aubry, N., Bousquet, Y., Ferland, J.M., Gillard, J., Lefebvre, S., Poirier, M., Tsantrizos, Y.S., Kukulj, G. and Beaulieu, P.L. (2004) Binding mode determination of benzimidazole inhibitors of the hepatitis C virus RNA polymerase by a structure and dynamics strategy. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 4306-4311.
- Lau, J.Y.N., Tam, R.C., Liang, T.J. and Hong, Z. (2002) Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology*, **35**, 1002-1009.
- Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F. and Pecheur, E.I. (2006) Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem*, **281**, 3909-3917.
- Lavillette, D., Morice, Y., Germanidis, G., Donot, P., Soulier, A., Pagkalos, E., Sakellariou, G., Intrator, L., Bartosch, B., Pawlotsky, J.M. and Cosset, F.L. (2005) Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol*, **79**, 6023-6034.
- Layden-Almer, J.E., Ribeiro, R.M., Wiley, T., Perelson, A.S. and Layden, T.J. (2003) Viral dynamics and response differences in HCV-infected African American and white patients treated with IFN and ribavirin. *Hepatology*, **37**, 1343-1350.
- Le Pogam, S., Kang, H., Harris, S.F., Leveque, V., Giannetti, A.M., Ali, S., Jiang, W.R., Rajyaguru, S., Tavares, G., Oshiro, C., Hendricks, T., Klumpp, K., Symons, J., Browner, M.F., Cammack, N. and Najera, I. (2006) Selection and characterization of replicon variants dually resistant to thumb- and palm-binding nonnucleoside polymerase inhibitors of the hepatitis C virus. *J Virol*, **80**, 6146-6154.
- Leijon, M., Graslund, A., Nielsen, P.E., Buchardt, O., Norden, B., Kristensen, S.M. and Eriksson, M. (1994) Structural characterization of PNA-DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in a B-like conformation. *Biochemistry*, **33**, 9820-9825.
- Lemon, S.M. (1997) Targeting the Achilles' heel of hepatitis C virus. *Hepatology*, **25**, 1035-1037.

- Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M.A., Trépo, C. and Inchauspé, G. (1998) In Vivo Tropism of Hepatitis C Virus Genomic Sequences in Hematopoietic Cells: Influence of Viral Load, Viral Genotype, and Cell Phenotype. *Blood*, **91**, 3841-3849.
- Lerat, H., Shimizu, Y.K. and Lemon, S.M. (2000) Cell Type-Specific Enhancement of Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation due to 5'Nontranslated Region Substitutions Selected during Passage of Virus in Lymphoblastoid Cells. *Journal of Virology*, **74**, 7024-7031.
- Li, D., Takyar, S.T., Lott, W.B. and Gowans, E.J. (2003) Amino acids 1-20 of the hepatitis C virus (HCV) core protein specifically inhibit HCV IRES-dependent translation in HepG2 cells, and inhibit both HCV IRES- and cap-dependent translation in HuH7 and CV-1 cells. *J Gen Virol*, **84**, 815-825.
- Li, H., Li, W.X. and Ding, S.W. (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, **296**, 1319-1321.
- Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale, M., Jr. and Lemon, S.M. (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2992-2997.
- Lieber, A., He, C.Y., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Barr, D. and Kay, M.A. (1996) Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol*, **70**, 8782-8791.
- Lima, W.F., Brown-Driver, V., Fox, M., Hanecak, R. and Bruice, T.W. (1997) Combinatorial screening and rational optimization for hybridization to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity. *J Biol Chem*, **272**, 626-638.
- Lin, C., Lin, K., Luong, Y.-P., Rao, B.G., Wei, Y.-Y., Brennan, D.L., Fulghum, J.R., Hsiao, H.-M., Ma, S., Maxwell, J.P., Cottrell, K.M., Perni, R.B., Gates, C.A. and Kwong, A.D. (2004a) In Vitro Resistance Studies of Hepatitis C Virus Serine Protease Inhibitors, VX-950 and BILN 2061: STRUCTURAL ANALYSIS INDICATES DIFFERENT RESISTANCE MECHANISMS. *J. Biol. Chem.*, **279**, 17508-17514.
- Lin, C.C., Luu, K., Lourenco, D. and Yeh, L.T. (2003) Pharmacokinetics and metabolism of [14C]viramidine in rats and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2458-2463.
- Lin, C.C., Xu, C., Zhu, N. and Yeh, L.T. (2006a) Absorption, metabolism, and excretion of [14C]viramidine in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 2368-2373.
- Lin, K., Kwong, A.D. and Lin, C. (2004b) Combination of a Hepatitis C Virus NS3-NS4A Protease Inhibitor and Alpha Interferon Synergistically Inhibits Viral RNA Replication and Facilitates Viral RNA Clearance in Replicon Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 4784-4792.
- Lin, K., Perni, R.B., Kwong, A.D. and Lin, C. (2006b) VX-950, a Novel Hepatitis C Virus (HCV) NS3-4A Protease Inhibitor, Exhibits Potent Antiviral Activities in HCV Replicon Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 1813-1822.
- Lin, Y., Qiu, Q., Gill, C. and Jayasena, S.D. (1994) Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5229-5234.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A. and Rice, C.M. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623-626.
- Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G. and Rice, C.M. (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3805-3809.
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2005) Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, **436**, 933-938.
- Liu, Y., Braasch, D.A., Nulf, C.J. and Corey, D.R. (2004) Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids. *Biochemistry*, **43**, 1921-1927.
- Liu, Y., Chen, Z. and He, N. (1997) [Inhibition of hepatitis C virus by antisense oligodeoxynucleotide in vitro]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **77**, 567-570.
- Ljungstrom, T., Knudsen, H. and Nielsen, P.E. (1999) Cellular uptake of adamantyl conjugated peptide nucleic acids. *Bioconjug Chem*, **10**, 965-972.
- Lo, K.M., Biasolo, M.A., Dehni, G., Palu, G. and Haseltine, W.A. (1992) Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. *Virology*, **190**, 176-183.
- Logvinoff, C., Major, M.E., Oldach, D., Heyward, S., Talal, A., Balfe, P., Feinstone, S.M., Alter, H., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2004) Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10149-10154.
- Lohmann, V., Korner, F., Dobierzewska, A. and Bartenschlager, R. (2001) Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation. *Journal of Virology*, **75**, 1437-1449.

- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U. and Bartenschlager, R. (1997) Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol*, **71**, 8416-8428.
- Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L. and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-113.
- Loke, S.L., Stein, C.A., Zhang, X.H., Mori, K., Nakanishi, M., Subasinghe, C., Cohen, J.S. and Neckers, L.M. (1989) Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci US A*, **86**, 3474-3478.
- Lot, F., Miguéres, B. and Abiteboul, D. (2005) Contaminations professionnelles par le VIH et le VHC chez le personnel de santé, France, situation au 31 décembre 2004. *BEH*, 115 - 116.
- Lu, S. and Cullen, B.R. (2004) Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol*, **78**, 12868-12876.
- Ludmerer, S.W., Graham, D.J., Boots, E., Murray, E.M., Simcoe, A., Markel, E.J., Grobler, J.A., Flores, O.A., Olsen, D.B. and Hazuda, D.J. (2004) Replication Fitness and NS5B Drug Sensitivity of Diverse Hepatitis C Virus Isolates Characterized by Using a Transient Replication Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**, 2059-2069.
- Ludwig, J., Blaschke, M. and Sproat, B.S. (1998) Extending the cleavage rules for the hammerhead ribozyme: mutating adenosine15.1 to inosine15.1 changes the cleavage site specificity from N16.2U16.1H17 to N16.2C16.1H17. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2279-2285.
- Lukavsky, P.J., Otto, G.A., Lancaster, A.M., Sarnow, P. and Puglisi, J.D. (2000) Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function. *Nat Struct Biol*, **7**, 1105-1110.
- Lundin, K.E., Good, L., Stromberg, R., Graslund, A., Smith, C.I.E. and Jeffrey C. Hall, J.C.D.T.F.a.V.v.H. (2006) Biological Activity and Biotechnological Aspects of Peptide Nucleic Acid. In *Advances in Genetics*. Academic Press, Vol. Volume 56, pp. 1-51.
- Maag, D., Castro, C., Hong, Z. and Cameron, C.E. (2001) Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J Biol Chem*, **276**, 46094-46098.
- MacQuillan, G.C., de Boer, W.B., Platten, M.A., McCaul, K.A., Reed, W.D., Jeffrey, G.P. and Allan, J.E. (2002) Intrahepatic MxA and PKR protein expression in chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol*, **68**, 197-205.
- Maier, M.A., Esau, C.C., Siwkowski, A.M., Wancewicz, E.V., Albertshofer, K., Kinberger, G.A., Kadaba, N.S., Watanabe, T., Manoharan, M., Bennett, C.F., Griffey, R.H. and Swayze, E.E. (2006) Evaluation of basic amphipathic peptides for cellular delivery of antisense peptide nucleic acids. *J Med Chem*, **49**, 2534-2542.
- Malcolm, B.A., Liu, R., Lahser, F., Agrawal, S., Belanger, B., Butkiewicz, N., Chase, R., Gheyas, F., Hart, A., Hesk, D., Ingravallo, P., Jiang, C., Kong, R., Lu, J., Pichardo, J., Prongay, A., Skelton, A., Tong, X., Venkatraman, S., Xia, E., Girijavallabhan, V. and Njoroge, F.G. (2006) SCH 503034, a Mechanism-Based Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3 Protease, Suppresses Polyprotein Maturation and Enhances the Antiviral Activity of Alpha Interferon in Replicon Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 1013-1020.
- Manns, M. (2006) Results of clinical trials with new protease and polymerase inhibitors. *12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, Paris, France.
- Manns, M.P. (2001) PEG-interferon-[alpha]2b plus ribavirin compared with interferon-[alpha]2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, **358**, 958-965.
- Manns, M.P., Wedemeyer, H. and Cornberg, M. (2006) Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, **55**, 1350-1359.
- Marie, I., Durbin, J.E. and Levy, D.E. (1998) Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J*, **17**, 6660-6669.
- Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J. and Gomez, J. (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol*, **66**, 3225-3229.
- Martin, A., Bodola, F., Sangar, D.V., Goettge, K., Popov, V., Rijnbrand, R., Lanford, R.E. and Lemon, S.M. (2003) Chronic hepatitis associated with GB virus B persistence in a tamarin after intrahepatic inoculation of synthetic viral RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 9962-9967.
- Martin, J.L., Veluraja, K., Ross, K., Johnson, L.N., Fleet, G.W., Ramsden, N.G., Bruce, I., Orchard, M.G., Oikonomakos, N.G., Papageorgiou, A.C. and et al. (1991) Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes. *Biochemistry*, **30**, 10101-10116.
- Martinand-Mari, C., Lebleu, B. and Robbins, I. (2003) Oligonucleotide-based strategies to inhibit human hepatitis C virus. *Oligonucleotides*, **13**, 539-548.

- Mayhood, T., Kaushik, N., Pandey, P.K., Kashanchi, F., Deng, L. and Pandey, V.N. (2000) Inhibition of Tat-mediated transactivation of HIV-1 LTR transcription by polyamide nucleic acid targeted to TAR hairpin element. *Biochemistry*, **39**, 11532-11539.
- McCaffrey, A. (2003) A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology*, **38**, 503-508.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Karimi, M., Contag, C.H. and Kay, M.A. (2003) A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology*, **38**, 503-508.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A. (2002) RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38-39.
- McCauley, T.G., Hamaguchi, N. and Stanton, M. (2003) Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Anal. Biochem.*, **319**, 244-250.
- McCormick, J.B., King, I.J., Webb, P.A., Scribner, C.L., Craven, R.B., Johnson, K.M., Elliott, L.H. and Belmont-Williams, R. (1986) Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med*, **314**, 20-26.
- McHutchison, J.G., Patel, K., Pockros, P., Nyberg, L., Pianko, S., Yu, R.Z., Dorr, F.A. and Kwoh, T.J. (2006) A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, **44**, 88-96.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K., Agol, V.I., Keene, J.D. and Sonenberg, N. (1993) La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol*, **67**, 3798-3807.
- Meffre, C., Le Strat, Y., Delarocque-Astagneau, E., Antona, D. and Desenclos, J.C. (2005) Estimation des taux de prévalence des anticorps anti-VHC et des marqueurs du virus de l'hépatite B chez les assurés sociaux du régime général de France métropolitaine, 2003-2004. *Analyse Descriptive InVS*, **23**.
- Mehta, S.H., Cox, A., Hoover, D.R., Wang, X.H., Mao, Q., Ray, S., Strathdee, S.A., Vlahov, D. and Thomas, D.L. (2002) Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*, **359**, 1478-1483.
- Melen, K., Keskinen, P., Lehtonen, A. and Julkunen, I. (2000) Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. *J Hepatol*, **33**, 764-772.
- Mercer, D.F. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature Med.*, **7**, 927-933.
- Meuleman, P. (2006) The human liver-uPA-SCID mouse: a chimeric rodent model for the study of viral hepatitis. *12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, Paris, France.
- Meunier, J.C., Engle, R.E., Faulk, K., Zhao, M., Bartosch, B., Alter, H., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2005) Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4560-4565.
- Meyer, K., Basu, A., Saito, K., Ray, R.B. and Ray, R. (2005) Inhibition of hepatitis C virus core protein expression in immortalized human hepatocytes induces cytochrome c-independent increase in Apaf-1 and caspase-9 activation for cell death. *Virology*, **336**, 198-207.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R. and Tschopp, J. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, **437**, 1167-1172.
- Mihm, S., Frese, M., Meier, V., Wietzke-Braun, P., Scharf, J.G., Bartenschlager, R. and Ramadori, G. (2004) Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. *Lab Invest*, **84**, 1148-1159.
- Miller, R.H. and Purcell, R.H. (1990) Hepatitis C Virus Shares Amino Acid Sequence Similarity with Pestiviruses and Flaviviruses as Well as Members of Two Plant Virus Supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, 2057-2061.
- Mizutani, T., Kato, N., Hirota, M., Sugiyama, K., Murakami, A. and Shimotohno, K. (1995) Inhibition of hepatitis C virus replication by antisense oligonucleotide in culture cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**, 906-911.
- Mo, H., Lu, L., Pilot-Matias, T., Pithawalla, R., Mondal, R., Masse, S., Dekhtyar, T., Ng, T., Koev, G., Stoll, V., Stewart, K.D., Pratt, J., Donner, P., Rockway, T., Maring, C. and Molla, A. (2005) Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 4305-4314.
- Monia, B.P., Johnston, J.F., Ecker, D.J., Zounes, M.A., Lima, W.F. and Freier, S.M. (1992) Selective inhibition of mutant Ha-ras mRNA expression by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem*, **267**, 19954-19962.
- Moore, P. and Balan, V. (2005) Modulation of interferon specific gene expression by Albuferon in subjects with chronic hepatitis C and correlation with anti-viral response. *40th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver*, Paris, France.
- Moradpour, D. and Blum, H.E. (2004) A primer on the molecular virology of hepatitis C. *Liver Int*, **24**, 519-525.

- Moya, A., Holmes, E.C. and Gonzalez-Candelas, F. (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 279-288.
- Muller, H.M., Pfaff, E., Goeser, T., Kallinowski, B., Solbach, C. and Theilmann, L. (1993) Peripheral blood leukocytes serve as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication. *J Gen Virol*, **74 (Pt 4)**, 669-676.
- Nadal, A., Robertson, H.D., Guardia, J. and Gomez, J. (2003) Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol*, **84**, 1545-1548.
- Nagano, Y. and Kojima, Y. (1958) Interference du virus vaccinal inactif avec l'infection du tissu dermique par le virus homologue actif. *C R Seances Soc Biol Fil*, **152**, 372-374.
- Nagasaka, A., Hige, S., Tsunematsu, I., Yoshida, J., Sasaki, Y., Matsushima, T. and Asaka, M. (1996) Changes in hepatitis C virus quasispecies and density populations in patients before and after interferon therapy. *J Med Virol*, **50**, 214-220.
- Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ecsodi, J., Boll, W., Cantell, K. and Weissmann, C. (1980) Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature*, **284**, 316-320.
- Nakajima, N., Hijikata, M., Yoshikura, H. and Shimizu, Y.K. (1996) Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J Virol*, **70**, 3325-3329.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Gambari, R., Borgatti, M., Bianchi, N., Feriotto, G. and Mischiati, C. (2000) Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids. *J Control Release*, **68**, 237-249.
- Nekhotiaeva, N., Awasthi, S.K., Nielsen, P.E. and Good, L. (2004) Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol Ther*, **10**, 652-659.
- Neumann, A.U. (1998) Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-[alpha] therapy. *Science*, **282**, 103-107.
- Nielsen, P.E. (1999) Applications of peptide nucleic acids. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 71-75.
- Nielsen, P.E. (2005) Addressing the challenges of cellular delivery and bioavailability of peptide nucleic acids (PNA). *Q Rev Biophys*, **38**, 345-350.
- Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. and Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**, 1497-1500.
- Niepmann, M., Petersen, A., Meyer, K. and Beck, E. (1997) Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, **71**, 8330-8339.
- Nishikawa, F., Funaji, K., Fukuda, K. and Nishikawa, S. (2004) In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides*, **14**, 114-129.
- Nishikawa, F., Kakiuchi, N., Funaji, K., Fukuda, K., Sekiya, S. and Nishikawa, S. (2003) Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1935-1943.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920-930.
- Noble, S.A., Bonham, M.A., Bisi, J.E., Bruckenstein, D.A., Brown, P.H., Brown, S.C., Cadilla, R., Gaul, M.D., Hanvey, J.C., Hassman, C.F., Josey, J.A., Luzzio, M.J., Myers, P.M., Pipe, A.J., Ricca, D.J., Su, C.W., Stevenson, C.L., Thomson, S.A., Wiethe, R.W. and Babiss, L.E. (1995) Impact of biophysical parameters on the biological assessment of peptide nucleic acids, antisense inhibitors of gene expression. *Drug Development Research*, **34**, 184-195.
- Nulf, C.J. and Corey, D. (2004a) Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res*, **32**, 3792-3798.
- Nulf, C.J. and Corey, D. (2004b) Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Research*, **32**, 3792-3798.
- O'Brien, C., Godofsky, E. and Rodriguez-Torres, M. (2005) Randomized trial of valopicitabine (NM283), alone or with peg-interferon, vs. retreatment with peg-interferon plus ribavirin (PegIFN/RBV) in hepatitis C patients with previous non-response to PegIFN/RBV: first interim results. *56 th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, abstract*, **63186**.
- Oketani, M., Asahina, Y., Wu, C.H. and Wu, G.Y. (1999) Inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression by a DNA ribonuclease. *J Hepatol*, **31**, 628-634.

- Okuda, M., Li, K., Beard, M.R., Showalter, L.A., Scholle, F., Lemon, S.M. and Weinman, S.A. (2002) Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, **122**, 366-375.
- OMS. (1999) Hepatitis C--global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec*, **74**, 425-427.
- Op De Beeck, A., Cocquerel, L. and Dubuisson, J. (2001) Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol*, **82**, 2589-2595.
- Osborne, S.E. and Ellington, A.D. (1997) Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem. Rev.*, **97**, 349-370.
- Otto, G.A. and Puglisi, J.D. (2004) The Pathway of HCV IRES-Mediated Translation Initiation. *Cell*, **119**, 369-380.
- Paeshuyse, J., Kaul, A., De Clercq, E., Rosenwirth, B., Dumont, J.M., Scalfaro, P., Bartenschlager, R. and Neyts, J. (2006) The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology*, **43**, 761-770.
- Paillart, J.C., Marquet, R., Skripkin, E., Ehresmann, C. and Ehresmann, B. (1996) Dimerization of retroviral genomic RNAs: structural and functional implications. *Biochimie*, **78**, 639-653.
- Park, Y.G., Nesterova, M., Agrawal, S. and Cho-Chung, Y.S. (1999) Dual blockade of cyclic AMP response element-(CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. gene-specific inhibition of tumor growth. *J Biol Chem*, **274**, 1573-1580.
- Patino, N., Di Giorgio, C., Dan-Covalciuc, C., Peytou, V., Terreux, R., Cabrol-Bass, D., Bailly, C. and Condom, R. (2002) Modelling, synthesis and biological evaluation of an ethidium-arginine conjugate linked to a ribonuclease mimic directed against TAR RNA of HIV-1. *Eur J Med Chem*, **37**, 573-584.
- Pattabiraman, N., Martinez, H.M. and Shapiro, B.A. (2002) Molecular modeling and dynamics studies of HIV-1 kissing loop structures. *J Biomol Struct Dyn*, **20**, 397-412.
- Patten, P.A., Howard, R.J. and Stemmer, W.P. (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 724-733.
- Pavio, N., Taylor, D.R. and Lai, M.M.C. (2002) Detection of a Novel Unglycosylated Form of Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein That Is Located in the Cytosol and Interacts with PKR. *Journal of Virology*, **76**, 1265-1272.
- Pavlovic, D., Neville, D.C.A., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B. and Zitzmann, N. (2003) The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 6104-6108.
- Pawlotsky, J.M. (1999) Hepatitis C virus(HCV) NS 5 A protein: role in HCV replication and resistance to interferon-alpha. *Journal of Viral Hepatitis*, **6**, 47-48.
- Pawlotsky, J.M. (2003) Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral Res*, **59**, 1-11.
- Pawlotsky, J.M. (2006) Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. *Hepatology*, **43**, S207-220.
- Pawlotsky, J.M., Dahari, H., Neumann, A.U., Hezode, C., Germanidis, G., Lonjon, I., Castera, L. and Dhumeaux, D. (2004) Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, **126**, 703-714.
- Pawlotsky, J.M., Germanidis, G., Neumann, A.U., Pellerin, M., Frainais, P.O. and Dhumeaux, D. (1998) Interferon Resistance of Hepatitis C Virus Genotype 1b: Relationship to Nonstructural 5A Gene Quasispecies Mutations. *Journal of Virology*, **72**, 2795-2805.
- Pawlotsky, J.M., Tsakiris, L., Roudot-Thoraval, F., Pellet, C., Stuyver, L., Duval, J. and Dhumeaux, D. (1995) Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*, **171**, 1607-1610.
- Pearse, M.J. and Drane, D. (2005) ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **57**, 465-474.
- Pekrun, K., Shibata, R., Igarashi, T., Reed, M., Sheppard, L., Patten, P.A., Stemmer, W.P., Martin, M.A. and Soong, N.W. (2002) Evolution of a human immunodeficiency virus type 1 variant with enhanced replication in pig-tailed macaque cells by DNA shuffling. *J Virol*, **76**, 2924-2935.
- Pellestor, F., Anahory, T. and Hamamah, S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. *Human Reproduction Update*, **11**, 15-32.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, **334**, 320-325.
- Peracchi, A. (2004) Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev. Med. Virol.*, **14**, 47-64.
- Perni, R., Chandorkar, G., Chaturvedi, P., Courtney, L., Decker, C., Gates, C., Harbeson, S., Kwong, A., Lin, C. and Luong, Y. (2003) VX-950: the discovery of an inhibitor of the hepatitis C NS 3· 4 A protease and a potential hepatitis C virus therapeutic. *Hepatology*, **38**, 624-624.

- Perni, R.B., Almquist, S.J., Byrn, R.A., Chandorkar, G., Chaturvedi, P.R., Courtney, L.F., Decker, C.J., Dinehart, K., Gates, C.A., Harbeson, S.L., Heiser, A., Kalkeri, G., Kolaczowski, E., Lin, K., Luong, Y.-P., Rao, B.G., Taylor, W.P., Thomson, J.A., Tung, R.D., Wei, Y., Kwong, A.D. and Lin, C. (2006) Preclinical Profile of VX-950, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3-4A Serine Protease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 899-909.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. and Samuel, C.E. (1987) Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*, **56**, 727-777.
- Petit, M.A., Lievre, M., Peyrol, S., De Sequeira, S., Berthillon, P., Ruigrok, R.W. and Trepo, C. (2005) Enveloped particles in the serum of chronic hepatitis C patients. *Virology*, **336**, 144-153.
- Phylactou, L.A. (2000) Ribozyme and peptide-nucleic acid-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, **44**, 97-108.
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M. and Cosset, F.L. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 7408.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D. and Bartenschlager, R. (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol*, **76**, 4008-4021.
- Pillonel, J. and Laperche, S. (2001) Surveillance des marqueurs d'une infection par le VIH, l'HTLV et les virus des hépatites B et C chez les donneurs de sang en France de 1991 à 2000. *Bull Epidemiol Hebdo*, **46**, 207-209.
- Pillonel, J. and Laperche, S. (2003) Risque résiduel de transmission du VIH, du VHC et du VHB par transfusion sanguine entre 1992 et 2002 en France et impact du dépistage génomique viral. *BEH*, **48**, 233 - 236.
- Polakos, N.K., Drane, D., Cox, J., Ng, P., Selby, M.J., Chien, D., O'Hagan, D.T., Houghton, M. and Paliard, X. (2001) Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J Immunol*, **166**, 3589-3598.
- Pooga, M., Soomets, U., Hallbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hokfelt, T., Bartfai, T. and Langel, U. (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol*, **16**, 857-861.
- Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S.S., Niederau, C., Minuk, G.S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S. and Trepo, C. (1998) Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*, **352**, 1426-1432.
- Poynard, T., Yuen, M.-F., Ratzin, V. and Lai, C.L. (2003) Viral hepatitis C. *The Lancet*, **362**, 2095-2100.
- Poyry, T., Kinnunen, L. and Hovi, T. (1992) Genetic variation in vivo and proposed functional domains of the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *J Virol*, **66**, 5313-5319.
- Prabhu, R., Vittal, P., Yin, Q., Flemington, E., Garry, R., Robichaux, W.H. and Dash, S. (2005) Small interfering RNA effectively inhibits protein expression and negative strand RNA synthesis from a full-length hepatitis C virus clone. *J Med Virol*, **76**, 511-519.
- Pulendran, B. (2004) Modulating vaccine responses with dendritic cells and toll-like receptors. *Immunological Reviews*, **199**, 227-250.
- Pulendran, B. and Ahmed, R. (2006) Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development. *Cell*, **124**, 849-863.
- Pybus, O.G., Charleston, M.A., Gupta, S., Rambaut, A., Holmes, E.C. and Harvey, P.H. (2001) The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science*, **292**, 2323-2325.
- Qiao, M. (2003) Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. *Hepatology*, **37**, 52-59.
- Radhakrishnan, S.K., Layden, T.J. and Gartel, A.L. (2004) RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*, **323**, 173-181.
- Radi, S. (2006) Débats de presse, scandale et mise en place d'une politique de prévention. A propos de l'hépatite C en Egypte. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, **54**, 1S45-41S52.
- Randall, G. and Rice, C.M. (2004) Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res*, **102**, 19-25.
- Rappuoli, R. (2004) From Pasteur to genomics: Progress and challenges in infectious diseases. *Nature Medicine*, **10**, 1177-1185.
- Rasmussen, F.W., Bendifallah, N., Zachar, V., Shiraishi, T., Fink, T., Ebbesen, P., Nielsen, P.E. and Koppelhus, U. (2006) Evaluation of transfection protocols for unmodified and modified peptide nucleic acid (PNA) oligomers. *Oligonucleotides*, **16**, 43-57.

- Rehermann, B. and Nascimbeni, M. (2005) Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, **5**, 215-229.
- Reiser, M., Hinrichsen, H., Benhamou, Y., Reesink, H.W., Wedemeyer, H., Avendano, C., Riba, N., Yong, C.L., Nehmiz, G. and Steinmann, G.G. (2005) Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology*, **41**, 832-835.
- Rembach, A., Turner, B.J., Bruce, S., Cheah, I.K., Scott, R.L., Lopes, E.C., Zagami, C.J., Beart, P.M., Cheung, N.S., Langford, S.J. and Cheema, S.S. (2004) Antisense peptide nucleic acid targeting GluR3 delays disease onset and progression in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J Neurosci Res*, **77**, 573-582.
- Rice, C.M. and You, S. (2005) Treating hepatitis C: can you teach old dogs new tricks? *Hepatology*, **42**, 1455-1458.
- Riguet, E., Tripathi, S., Chaubey, B., Desire, J., Pandey, V.N. and Decout, J.L. (2004) A peptide nucleic acid-neamine conjugate that targets and cleaves HIV-1 TAR RNA inhibits viral replication. *J Med Chem*, **47**, 4806-4809.
- Robaczewska, M., Narayan, R., Seigner, B., Schorr, O., Thermet, A., Podhajska, A.J., Trepo, C., Zoulim, F., Nielsen, P.E. and Cova, L. (2005) Sequence-specific inhibition of duck hepatitis B virus reverse transcription by peptide nucleic acids (PNA). *J Hepatol*, **42**, 180-187.
- Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D. and Bixby, J. (1998) The evolution of the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*, **18**, 805-816.
- Robertson, B. (1998) Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch. Virol.*, **143**, 2493-2503.
- Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, **6**, 3343-3353.
- Romero-Lopez, C., Barroso-delJesus, A., Puerta-Fernandez, E. and Berzal-Herranz, A. (2005) Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biol Chem*, **386**, 183-190.
- Romig, T.S., Bell, C. and Drolet, D.W. (1999) Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **731**, 275-284.
- Roudot-Thoraval, F. (2001) Place des hépatites nosocomiales dans l'infection à VHC. *Annales de biologie clinique(Paris)*, **59**, 9-11.
- Roudot-Thoraval, F., Bastie, A., Pawlotsky, J.M. and Dhumeaux, D. (1997) Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. The Study Group for the Prevalence and the Epidemiology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, **26**, 485-490.
- Rubbia-Brandt, L., Quadri, R., Abid, K., Giostra, E., Male, P.J., Mentha, G., Spahr, L., Zarski, J.P., Borisch, B., Hadengue, A. and Negro, F. (2000) Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3. *J Hepatol*, **33**, 106-115.
- Rumin, S., Berthillon, P., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Trabaud, M.A., Bizollon, T., Gouillat, C., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C., Inchausp, G. and Treppe, C. (1999) Dynamic analysis of hepatitis C virus replication and quasispecies selection in long-term cultures of adult human hepatocytes infected in vitro. *J Gen Virol*, **80**, 3007-3018.
- Ryu, K.J. and Lee, S.W. (2004) Comparative analysis of intracellular trans-splicing ribozyme activity against hepatitis C virus internal ribosome entry site. *J Microbiol*, **42**, 361-364.
- Sabariego, R., Nadal, A., Beguiristain, N., Piron, M. and Gomez, J. (2004) Catalytic RNase P RNA from *Synechocystis* sp. cleaves the hepatitis C virus RNA near the AUG start codon. *FEBS Lett*, **577**, 517-522.
- Sachs, A.B., Sarnow, P. and Hentze, M.W. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, **89**, 831-838.
- Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 11646-11651.
- Sakamoto, N., Wu, C.H. and Wu, G.Y. (1996) Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *J Clin Invest*, **98**, 2720-2728.
- Samuel, C.E. (1991) Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*, **183**, 1-11.
- Samuel, C.E. (1993) The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans.
- Samuel, C.E. (1998) Protein-Nucleic Acid Interactions and Cellular Responses to Interferon. *Methods*, **15**, 161-165.
- Samuel, C.E. (2001) Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 778-809.

- San Francisco, C., Zeuzem, S. and In, H.C.V. (2006) Possible treatments for hepatitis C—what's currently in the pipeline? *Pharmaceutical Journal (Vol 276)*.
- Sandberg, J.A., Parker, V.P., Blanchard, K.S., Sweedler, D., Powell, J.A., Kachensky, A., Bellon, L., Usman, N., Rossing, T., Borden, E. and Blatt, L.M. (2000) Pharmacokinetics and tolerability of an antiangiogenic ribozyme (ANGIOZYME) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, **40**, 1462-1469.
- Sands, H., Gorey-Feret, L.J., Cocuzza, A.J., Hobbs, F.W., Chidester, D. and Trainor, G.L. (1994) Biodistribution and metabolism of internally 3H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Mol Pharmacol*, **45**, 932-943.
- Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1998) Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. *Biochemistry*, **37**, 13330-13342.
- Sarcar, B., Ghosh, A.K., Steele, R., Ray, R. and Ray, R.B. (2004) Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology*, **322**, 51-60.
- Sarver, N., Cantin, E.M., Chang, P.S., Zaia, J.A., Ladne, P.A., Stephens, D.A. and Rossi, J.J. (1990) Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science*, **247**, 1222-1225.
- Scarfì, S., Giovine, M., Gasparini, A., Damonte, G., Millo, E., Pozzolini, M. and Benatti, U. (1999) Modified peptide nucleic acids are internalized in mouse macrophages RAW 264.7 and inhibit inducible nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, **451**, 264-268.
- Schinkel, J., Spoon, W.J. and Kroes, A.C. (2004) Meta-analysis of mutations in the NS5A gene and hepatitis C virus resistance to interferon therapy: uniting discordant conclusions. *Antivir Ther*, **9**, 275-286.
- Schultz, D.E., Hardin, C.C. and Lemon, S.M. (1996) Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J Biol Chem*, **271**, 14134-14142.
- Schwergold, C., Depecker, G., Giorgio, C.D., Patino, N., Jossinet, F., Ehresmann, B., Terreux, R., Cabrol-Bass, D. and Condom, R. (2002) Cyclic PNA hexamer-based compound: modelling, synthesis and inhibition of the HIV-1 RNA dimerization process. *Tetrahedron*, **38**, 5675-5687.
- Seeff, L.B. (2002) Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, **36**, S35-46.
- Seipp, S., Mueller, H.M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L. and Goeser, T. (1997) Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro. *J Gen Virol*, **78**, 2467-2476.
- Seki, M. and Honda, Y. (1995a) Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: in vitro translation assay. *J Biochem*, **118**, 1199-1204.
- Seki, M. and Honda, Y. (1995b) Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides capable of inhibiting hepatitis C virus gene expression: in vitro translation assay. *J Biochem (Tokyo)*, **118**, 1199-1204.
- Sekiya, S., Nishikawa, F., Fukuda, K. and Nishikawa, S. (2003) Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease. *J Biochem (Tokyo)*, **133**, 351-359.
- Sen, A., Steele, R., Ghosh, A.K., Basu, A., Ray, R. and Ray, R.B. (2003) Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res*, **96**, 27-35.
- Shakin, S.H. and Liebhaber, S.A. (1986) Destabilization of messenger RNA/complementary DNA duplexes by the elongating 80 S ribosome. *J Biol Chem*, **261**, 16018-16025.
- Shammas, M.A., Simmons, C.G., Corey, D.R. and Shmookler Reis, R.J. (1999) Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. *Oncogene*, **18**, 6191-6200.
- Sharma, H.W., Perez, J.R., Higgins-Sochaski, K., Hsiao, R. and Narayanan, R. (1996) Transcription factor decoy approach to decipher the role of NF-kappa B in oncogenesis. *Anticancer Res*, **16**, 61-69.
- Shaw, J.P., Kent, K., Bird, J., Fishback, J. and Froehler, B. (1991) Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res*, **19**, 747-750.
- Shepard, C.W., Finelli, L. and Alter, M.J. (2005) Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*, **5**, 558-567.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. and Klucher, K.M. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*, **4**, 63-68.
- Shimizu, A., Koyama, M., Okuda, Y., Takase, K., Nakano, T. and Tameda, Y. (1998) Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: a case report and review of the Japanese literature. *Hepatogastroenterology*, **45**, 2352-2355.
- Shimizu, Y.K., Iwamoto, A., Hijikata, M., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1992) Evidence for invitro replication of hepatitis-c virus genome in a human t-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5477-5481.

- Shimizu, Y.K., Purcell, R.H. and Yoshikura, H. (1993) Correlation between the infectivity of hepatitis C virus in vivo and its infectivity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6037-6041.
- Shimoike, T., Koyama, C., Murakami, K., Suzuki, R., Matsuura, Y., Miyamura, T. and Suzuki, T. (2006) Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop IIIId domain of IRES and the viral core protein. *Virology*, **345**, 434-445.
- Shiraishi, T. and Nielsen, P.E. (2004) Down-regulation of MDM2 and activation of p53 in human cancer cells by antisense 9-aminoacridine-PNA (peptide nucleic acid) conjugates. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4893-4902.
- Sidwell, R.W., Huffman, J.H. and Khare, L. (1972) Broad-Spectrum Antiviral Activity of Virazole: 1-f 8- D-Ribofuranosyl- 1, 2, 4-triazole- 3-carboxamide. *Science*, **177**, 705.
- Simmonds, P. (1999) Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol*, **31 Suppl 1**, 54-60.
- Simmonds, P. (2004a) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*, **85**, 3173-3188.
- Simmonds, P. (2004b) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. *J Gen Virol*, **85**, 3173-3188.
- Singh, S.K., Kumar, R. and Wengel, J. (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *J Org Chem*, **63**, 6078-6079.
- Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N. and Hellen, C.U. (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol*, **72**, 4775-4782.
- Sjogren, M.H., Sjogren, R., Holtzmuller, K., Winston, B., Butterfield, B., Drake, S., Watts, A., Howard, R. and Smith, M. (2005) Interferon alfacon-1 and ribavirin versus interferon alpha-2b and ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, **50**, 727-732.
- Sl, T. and Katze, M.G. (2001) How Hepatitis C Virus Counteracts the Interferon Response: The Jury Is Still out on NS5A. *Virology*, **284**, 1-12.
- Sleutels, F., Zwart, R. and Barlow, D.P. (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, **415**, 810-813.
- Smith, D.B., Mellor, J., Jarvis, L.M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., Yap, P.L. and Simmonds, P. (1995) Variation of the hepatitis C virus 5'non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *Journal of General Virology*, **76**, 1749-1761.
- Smith, R.E.T. (2006) Hepatitis C virus therapies. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 715-716.
- Smith, R.M., Walton, C.M., Wu, C.H. and Wu, G.Y. (2002) Secondary structure and hybridization accessibility of hepatitis C virus 3'-terminal sequences. *J Virol*, **76**, 9563-9574.
- Soler, M., Pellerin, M., Malnou, C.E., Dhumeaux, D., Kean, K.M. and Pawlotsky, J.M. (2002) Quasispecies heterogeneity and constraints on the evolution of the 5'noncoding region of hepatitis C virus (HCV): relationship with HCV resistance to interferon-alpha therapy. *Virology*, **298**, 160-173.
- Song, Y., Friebe, P., Tzima, E., Junemann, C., Bartenschlager, R. and Niepmann, M. (2006) The Hepatitis C Virus RNA 3'-Untranslated Region Strongly Enhances Translation Directed by the Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.*, **80**, 11579-11588.
- Sooter, L.J. (2001) Towards automated nucleic acid enzyme selection. *Biol. Chem.*, **9**, 1327-1334.
- Stark, J.J., Dillman, R.O., Schulof, R., Wiemann, M.C., Barth, N.M., Honeycutt, P.J. and Soori, G. (1998) Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program. *Cancer*, **82**, 1677-1681.
- Stein, C.A. and Krieg, A.M. (1994) Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res Dev*, **4**, 67-69.
- Steitz, T.A. and Moore, P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci*, **28**, 411-418.
- Stoneley, M., Chappell, S.A., Jopling, C.L., Dickens, M., MacFarlane, M. and Willis, A.E. (2000) c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 1162-1169.
- Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A. and Willis, A.E. (1998) C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, **16**, 423-428.
- Summerton, A.M. (1989) *Uncharged nucleic acid analogs for therapeutic and diagnostic applications: oligomers assembled from ribose-derived subunits*. Brakel C, Portofolio, Woodland, TX.
- Sumpter, R., Jr., Loo, Y.-M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2005a) Regulating Intracellular Antiviral Defense and Permissiveness to Hepatitis C Virus RNA Replication through a Cellular RNA Helicase, RIG-I. *J. Virol.*, **79**, 2689-2699.

- Sumpter, R., Jr., Loo, Y.M., Foy, E., Li, K., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M. and Gale, M., Jr. (2005b) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*, **79**, 2689-2699.
- Sun, L.Q., Wang, L., Gerlach, W.L. and Symonds, G. (1995) Target sequence-specific inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2909-2913.
- Sun, L.Q., Warrilow, D., Wang, L., Witherington, C., Macpherson, J. and Symonds, G. (1994) Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type I replication in permissive cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9715-9719.
- Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.
- Sundquist, B. and Oberg, B. (1979) Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. *J. GEN. VIROL.*, **45**, 273-281.
- Svitkin, Y.V., Pause, A. and Sonenberg, N. (1994) La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol*, **68**, 7001-7007.
- Takahashi, H., Hamazaki, H., Habu, Y., Hayashi, M., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N. and Takaku, H. (2004) A new modified DNA enzyme that targets influenza virus A mRNA inhibits viral infection in cultured cells. *FEBS Lett*, **560**, 69-74.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, **21**, 335-376.
- Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Hidajat, R., Tanaka, M., Mizuta, H. and Hotta, H. (2004) Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol*, **48**, 591-598.
- Tallet-Lopez, B., Aldaz-Carroll, L., Chabas, S., Dausse, E., Staedel, C. and Toulme, J.J. (2003) Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent in vitro translation. *Nucleic Acids Res*, **31**, 734-742.
- Tam, R.C., Pai, B., Bard, J., Lim, C., Averett, D.R., Phan, U.T. and Milovanovic, T. (1999) Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. *J Hepatol*, **30**, 376-382.
- Tan, S.L., Pause, A., Shi, Y. and Sonenberg, N. (2002) Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 867-881.
- Tang, X.B., Hobom, G. and Luo, D. (1994) Ribozyme mediated destruction of influenza A virus in vitro and in vivo. *J Med Virol*, **42**, 385-395.
- Taniguchi, T., Sakai, M., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Kobayashi, S. and Sudo, T. (1979) Construction and identification of a bacterial plasmid containing the human fibroblast interferon gene sequence. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci*, **55**, 464.
- Taylor, D.R., Puig, M., Darnell, M.E.R., Mihalik, K. and Feinstone, S.M. (2004) New Antiviral Pathway That Mediates Hepatitis C Virus Replicon Interferon Sensitivity through ADAR1. *Journal of Virology*, **79**, 6291-6298.
- Thelu, M.A., Drouet, E., Hilleret, M.N. and Zarski, J.P. (2004) Lack of clinical significance of variability in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J Med Virol*, **72**, 396-405.
- Thomis, D.C. and Samuel, C.E. (1992) Mechanism of interferon action: autoregulation of RNA-dependent P1/eIF-2 {alpha} protein kinase (PKR) expression in transfected mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci US A*, **89**, 10837-10841.
- Tian, M.M., Wang, F., Niu, J.Q. and Wang, M.X. (2004) [Study on the cleavage activity of U1 small nuclear RNA chimeric ribozyme against HCV RNA in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **12**, 749-751.
- Tipples, G. (1996) Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*, **24**, 714-717.
- Tischendorf, J.J., Beger, C., Korf, M., Manns, M.P. and Kruger, M. (2004) Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication. *Arch Virol*, **149**, 1955-1970.
- Tokita, H., Okamoto, H., Tsuda, F., Song, P., Nakata, S., Chosa, T., Iizuka, H., Mishiroy, S., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1994) Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11022-11026.
- Tomassini, J., Selnick, H., Davies, M.E., Armstrong, M.E., Baldwin, J., Bourgeois, M., Hastings, J., Hazuda, D., Lewis, J. and McClements et, a. (1994) Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid compounds. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **38**, 2827-2837.
- Tomei, L., Altamura, S., Bartholomew, L., Biroccio, A., Ceccacci, A., Pacini, L., Narjes, F., Gennari, N., Bisbocci, M., Incitti, I., Orsatti, L., Harper, S., Stansfield, I., Rowley, M., De Francesco, R. and Migliaccio, G. (2003)

- Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol*, **77**, 13225-13231.
- Tomei, L., Altamura, S., Bartholomew, L., Bisbocci, M., Bailey, C., Bosserman, M., Cellucci, A., Forte, E., Incitti, I., Orsatti, L., Koch, U., De Francesco, R., Olsen, D.B., Carroll, S.S. and Migliaccio, G. (2004) Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol*, **78**, 938-946.
- Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R. and La Monica, N. (1993) NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *Journal of Virology*, **67**, 4017-4026.
- Tong, X., Chase, R., Skelton, A., Chen, T., Wright-Minogue, J. and Malcolm, B.A. (2006) Identification and analysis of fitness of resistance mutations against the HCV protease inhibitor SCH 503034. *Antiviral Research*, **70**, 28-38.
- Toniutto, P., Fabris, C. and Pirisi, M. (2006) Antiviral treatment of hepatitis C. *Expert Opin Pharmacother*, **7**, 2025-2035.
- Toulme, J.J. (2000) Aptamers: selected oligonucleotides for therapy. *Curr Opin Mol Ther*, **2**, 318-324.
- Toulme, J.J., Darfeuille, F., Kolb, G., Chabas, S. and Staedel, C. (2003) Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell*, **95**, 229-238.
- Toulme, J.J., Di Primo, C. and Boucard, D. (2004) Regulating eukaryotic gene expression with aptamers. *FEBS Lett.*, **567**, 55-62.
- Trepanier, J., Tanner, J.E., Momparler, R.L., Le, O.N., Alvarez, F. and Alfieri, C. (2006a) Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J Viral Hepat*, **13**, 131-138.
- Trepanier, J.B., Tanner, J.E. and Alfieri, C. (2006b) Oligonucleotide-based therapeutic options against hepatitis C virus infection. *Antivir Ther*, **11**, 273-287.
- Tripathi, S., Chaubey, B., Ganguly, S., Harris, D., Casale, R.A. and Pandey, V.N. (2005) Anti-HIV-1 activity of anti-TAR polyamide nucleic acid conjugated with various membrane transducing peptides. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4345-4356.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **66**, 1476-1483.
- Tyler, B.M., McCormick, D.J., Hoshall, C.V., Douglas, C.L., Jansen, K., Lacy, B.W., Cusack, B. and Richelson, E. (1998) Specific gene blockade shows that peptide nucleic acids readily enter neuronal cells in vivo. *FEBS Lett*, **421**, 280-284.
- Uhlenbeck, O.C., Dahm, S.C., Ruffner, D.E. and Fedor, M.J. (1989) Structure and mechanism of the hammerhead self-cleaving domain. *Nucleic Acids Symp Ser*, 95-96.
- Uhlmann, E. (1998) Peptide nucleic acids (PNA) and PNA-DNA chimeras: from high binding affinity towards biological function. *Biol Chem*, **379**, 1045-1052.
- Umehara, T., Fukuda, K., Nishikawa, F., Kohara, M., Hasegawa, T. and Nishikawa, S. (2005) Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 339-347.
- Urvil, P.T., Kakiuchi, N., Zhou, D.M., Shimotohno, K., Kumar, P.K. and Nishikawa, S. (1997) Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem*, **248**, 130-138.
- Vaccines, P. (1999) WHO Position Paper. *Weekly Epidemiological Record*, **74**, 137-142.
- Valeant-Pharmaceuticals. (2006) Valeant Pharmaceuticals Reports VISER2 Results for Viramidine®. Company Initiates Phase 2b Weight-Based Dose-Ranging Study. Valeant Pharmaceuticals International, Costa Mesa.
- Vidalin, O., Major, M.E., Rayner, B., Imbach, J.L., Trepo, C. and Inchauspe, G. (1996a) In vitro inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 2337-2344.
- Vidalin, O., Major, M.E., Rayner, B., Imbach, J.L., Trepo, C. and Inchauspe, G. (1996b) In vitro inhibition of hepatitis C virus gene expression by chemically modified antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 2337-2344.
- Vilcek, J. (2003) Novel interferons. *Nat Immunol*, **4**, 69-77.
- Vo, N.V., Oh, J.W. and Lai, M.M. (2003) Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology*, **307**, 301-316.
- Voisset, C. and Dubuisson, J. (2004) Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol. Cell*, **96**, 413-420.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Vuillermoz, I., Khattab, E., Sablon, E., Ottevaere, I., Durantel, D., Vieux, C., Trepo, C. and Zoulim, F. (2004) Genetic variability of hepatitis C virus in chronically infected patients with viral breakthrough during interferon-ribavirin therapy. *J Med Virol*, **74**, 41-53.

- Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, **10**, 310-315.
- Wagner, C., Palacios, I., Jaeger, L., St Johnston, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Brunel, C. (2001) Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J Mol Biol*, **313**, 511-524.
- Wagner, R.W., Matteucci, M.D., Grant, D., Huang, T. and Froehler, B.C. (1996) Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. *Nat Biotechnol*, **14**, 840-844.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H.G., Mizokami, M., Bartenschlager, R. and Liang, T.J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, **11**, 791-796.
- Wakita, T. and Wands, J.R. (1994a) Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *J Biol Chem*, **269**, 14205-14210.
- Wakita, T. and Wands, J.R. (1994b) Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides. In vitro model for selection of target sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 14205-14210.
- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D. and Branch, A.D. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA-A Pub. RNA Soc.*, **7**, 710-721.
- Wang, C., Sarnow, P. and Siddiqui, A. (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, **67**, 3338-3344.
- Wang, C., Sarnow, P. and Siddiqui, A. (1994) A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol*, **68**, 7301-7307.
- Wang, G., Xu, X., Pace, B., Dean, D.A., Glazer, P.M., Chan, P., Goodman, S.R. and Shokolenko, I. (1999) Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated induction of human gamma-globin gene expression. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2806-2813.
- Wang, H., Shen, X.T., Ye, R., Lan, S.Y., Xiang, L. and Yuan, Z.H. (2005a) Roles of the polypyrimidine tract and 3' noncoding region of hepatitis C virus RNA in the internal ribosome entry site-mediated translation. *Arch Virol*, **150**, 1085-1099.
- Wang, Q., Contag, C.H., Ilves, H., Johnston, B.H. and Kaspar, R.L. (2005b) Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model. *Mol Ther*, **12**, 562-568.
- Wang, S., Wang, X., Guan, W. and Li, M. (2000) Specific regulatory inhibition of transfected HepG(2) with HCV 5'NCR by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **8**, 288-290.
- Wang, X.H., Wang, S.Q., Wen, S.Y., Guan, W. and Mao, B.Z. (2001) [The inhibitory effects of hepatocyte targeting pH-sensitive liposome mediated phosphorothioate antisense oligonucleotide on gene expression controlled by HCV 5'NCR]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, **17**, 626-630.
- Wang, Y., Kato, N., Jazag, A., Dharel, N., Otsuka, M., Taniguchi, H., Kawabe, T. and Omata, M. (2006) Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, **130**, 883-892.
- Weber, H., Valenzuela, D., Lujber, G., Gubler, M. and Weissmann, C. (1987) Single amino acid changes that render human IFN-alpha 2 biologically active on mouse cells. *Embo J*, **6**, 591-598.
- Weerasinghe, M., Liem, S.E., Asad, S., Read, S.E. and Joshi, S. (1991) Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4+ lymphocyte-derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme. *J Virol*, **65**, 5531-5534.
- Weiner, A.J. (2001) Intrahepatic genetic inoculation of hepatitis C virus RNA confers cross-protective immunity. *J. Virol.*, **75**, 7142-7148.
- Welch, P.J., Tritz, R., Yei, S., Leavitt, M., Yu, M. and Barber, J. (1996) A potential therapeutic application of hairpin ribozymes: in vitro and in vivo studies of gene therapy for hepatitis C virus infection. *Gene Ther*, **3**, 994-1001.
- Welch, P.J., Yei, S. and Barber, J.R. (1998) Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol*, **10**, 163-171.
- Wheelock, E.F. (1965) Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. *Science*, **149**, 310.
- Wickstrom, E. (1986) Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *J Biochem Biophys Methods*, **13**, 97-102.
- Wilson, J.A. and Richardson, C.D. (2005) Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol*, **79**, 7050-7058.
- Winkler, K.E. (2004) Killing the messenger. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 823-824.

- Wu, C.H. and Wu, G.Y. (1998) Targeted inhibition of hepatitis C virus-directed gene expression in human hepatoma cell lines. *Gastroenterology*, **114**, 1304-1312.
- Wu, J.Z., Lin, C.C. and Hong, Z. (2003) Ribavirin, viremagine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation: implication for nucleoside prodrug design. *J Antimicrob Chemother*, **52**, 543-546.
- Wu, Y., Yu, L., McMahon, R., Rossi, J.J., Forman, S.J. and Snyder, D.S. (1999) Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Hum Gene Ther*, **10**, 2847-2857.
- Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P. and Prieto, J. (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews. *Virology*, **244**, 513-520.
- Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. and Bukh, J. (1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 8738-8743.
- Yanagi, M., StClaire, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (1999) In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Nat Acad Sci Usa*, **96**, 2291-2295.
- Yang, Q. and Sarnow, P. (1997) Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA: evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2800-2807.
- Ye, X., Fong, P., Iizuka, N., Choate, D. and Cavener, D.R. (1997) Ultrabithorax and Antennapedia 5' untranslated regions promote developmentally regulated internal translation initiation. *Mol Cell Biol*, **17**, 1714-1721.
- Yen, J.H., Chang, S.C., Hu, C.R., Chu, S.C., Lin, S.S., Hsieh, Y.S. and Chang, M.F. (1995) Cellular proteins specifically bind to the 5'-noncoding region of hepatitis C virus RNA. *Virology*, **208**, 723-732.
- Yi, M., Tong, X., Skelton, A., Chase, R., Chen, T., Prongay, A., Bogen, S.L., Saksena, A.K., Njoroge, F.G., Veselenak, R.L., Pyles, R.B., Bourne, N., Malcolm, B.A. and Lemon, S.M. (2006) Mutations conferring resistance to SCH6, a novel hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor. Reduced RNA replication fitness and partial rescue by second-site mutations. *J Biol Chem*, **281**, 8205-8215.
- Young, K.C., Lindsay, K.L., Lee, K.J., Liu, W.C., He, J.W., Milstein, S.L. and Lai, M.M. (2003) Identification of a ribavirin-resistant NS5B mutation of hepatitis C virus during ribavirin monotherapy. *Hepatology*, **38**, 869-878.
- Yu, Y.C., Gu, C.H., Wang, S.Q., Mao, Q., Chen, Z.B. and Liu, H.L. (2003) [Activity of specific deoxyribozymes to cleave hepatitis C virus RNA in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **11**, 156-158.
- Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 280-284.
- Zeuzem, S. (2004) Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med*, **140**, 370-381.
- Zeuzem, S., Pawlotsky, J.M., Lukasiewicz, E., von Wagner, M., Goulis, I., Lurie, Y., Gianfranco, E., Vrolijk, J.M., Esteban, J.I., Hezode, C., Lagging, M., Negro, F., Soulier, A., Verheij-Hart, E., Hansen, B., Tal, R., Ferrari, C., Schalm, S.W. and Neumann, A.U. (2005a) International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*, **43**, 250-257.
- Zeuzem, S., Sarrazin, C., Wagner, F., Rouzier, R., Forester, N. and Gupta, S. (2005b) Combination therapy with the HCV protease inhibitor, SCH 503034, plus PEG-Intron in hepatitis C genotype-1 PEG-Intron non-responders: phase Ib results. *Hepatology*, **42**.
- Zhang, H. (1999) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV vaccinia virus recombinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 347-353.
- Zhang, H., Hanecak, R., Brown-Driver, V., Azad, R., Conklin, B., Fox, M.C. and Anderson, K.P. (1999) Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 347-353.
- Zhang, Z., Blank, M. and Schluesener, H.J. (2004) Nucleic acid aptamers in human viral disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **52**, 307-315.
- Zhao, Q., Tamsamani, J., Iadarola, P.L., Jiang, Z. and Agrawal, S. (1996) Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol*, **51**, 173-182.
- Zhao, Q., Tamsamani, J., Zhou, R.Z. and Agrawal, S. (1997) Pattern and kinetics of cytokine production following administration of phosphorothioate oligonucleotides in mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **7**, 495-502.
- Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E. and Baumert, T.F. (2002) Primary hepatocytes of *Tupaia belangeri* as a potential model for hepatitis C virus infection. *J Clin Invest*, **109**, 221-232.

- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T. and Chisari, F.V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9294-9299.
- Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B.M., Malcolm, B.A. and Reyes, G.R. (2003) The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology*, **310**, 333-342.
- Zhu, H. (2003) Gene expression associated with interferon alfa antiviral activity in an HCV replicon cell line. *Hepatology*, **37**, 1180-1188.
- Zylberberg, H., Thiers, V., Lagorce, D., Squadrito, G., Leone, F., Berthelot, P., Brechot, C. and Pol, S. (1999) Epidemiological and virological analysis of couples infected with hepatitis C virus. *Gut*, **45**, 112-116.

TITRE : Développement de nouvelles approches antivirales du virus de l'hépatite C basées sur l'utilisation d'interférons alpha variants et d'antisens de type *Peptide Nucleic Acids*.

RESUMÉ : L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) demeure une cause majeure de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire. Compte tenu d'une efficacité encore insuffisante des thérapies actuelles (55% de succès en moyenne), le développement de nouvelles stratégies antivirales reste une priorité. Dans ce contexte, nos travaux ont porté sur l'évaluation de nouveaux variants de l'interféron alpha dans un modèle de réplicon VHC. Nous avons pu identifier un variant, GEA007.1 qui présente une activité anti-VHC supérieure à celle de l'IFN alpha-2b utilisé en clinique associé à une plus grande efficacité de transduction du signal. Nous avons également évalué une approche antisens avec des molécules de type Peptide Nucleic Acids (PNA) et montré qu'elle permettait d'inhiber la traduction *in vitro* du VHC par blocage de la région interne d'entrée du ribosome (IRES), de manière plus efficace et spécifique qu'une approche antisens avec des molécules de premières générations. Une telle stratégie se justifie par la conservation de la cible qui pourrait se révéler utile avec l'utilisation prochaine des anti-protéases et anti-polymérases du VHC et le risque inhérent d'apparition de résistances au traitement. L'ensemble de ces résultats montre que l'amélioration de la bithérapie actuelle est possible et que de nouvelles approches thérapeutiques fonctionnent.

TITLE : Development of new antiviral approaches of hepatitis C virus based on interferon-alpha variants and Peptide Nucleic Acids antisense.

ABSTRACT : Infection by hepatitis C virus (HCV) remains a major cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current treatments are successful in about 55% of the cases. Development of new antiviral strategies thus remains a priority. In this global context, we have evaluated new interferon-alpha variants in a subgenomic HCV replicon system. We could identified a variant, GEA007.1 which exhibits a more potent inhibitory activity towards HCV compared to currently used IFN alpha-2b associated with an higher signal transduction efficacy. We have also evaluated an antisense approach with Peptide Nucleic Acids (PNA) molecules and showed its efficacy to inhibit HCV *in vitro* translation by blocking the internal ribosome entry site (IRES), in a much specific and efficient way compared with first generation antisense molecules. Such a strategy is justified by the high degree of conservation of the target which could be useful with the future use of anti HCV protease and anti HCV polymerase and the risk that resistance against treatment may appear. Taken together, our results suggest that improving actual combination therapy is possible and that new therapeutical approaches work.

DISCIPLINE : Virologie

MOTS-CLES : Virus de l'hépatite C (VHC) ; interféron (IFN) ; réplicon sous génomique ; oligonucléotides antisens ; Peptide Nucleic Acid (PNA)

KEYWORDS : Hepatitis C virus (HCV) ; interferon (IFN) ; subgenomic replicon ; antisense oligonucleotides ; Peptide Nucleic Acid (PNA)

LABORATOIRE : INSERM Unité 871
Physiopathologie moléculaire et nouveaux traitements des hépatites virales
151, cours Albert Thomas
69424 LYON cedex 03