

# 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

Soutenance de thèse, 9 mars 2007

**Amaury MARTIN**

Directeur de thèse: Olivier HANTZ

**Inserm**

Unité INSERM 271 (871)  
Dirigée par C. TREPO (F. ZOULIM)

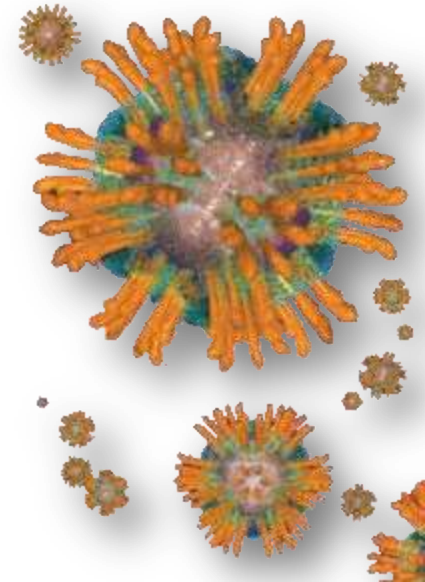
Université Claude Bernard



# Plan

- Données Bibliographiques
- Objectif des travaux
- Résultats
- Conclusion & Perspectives

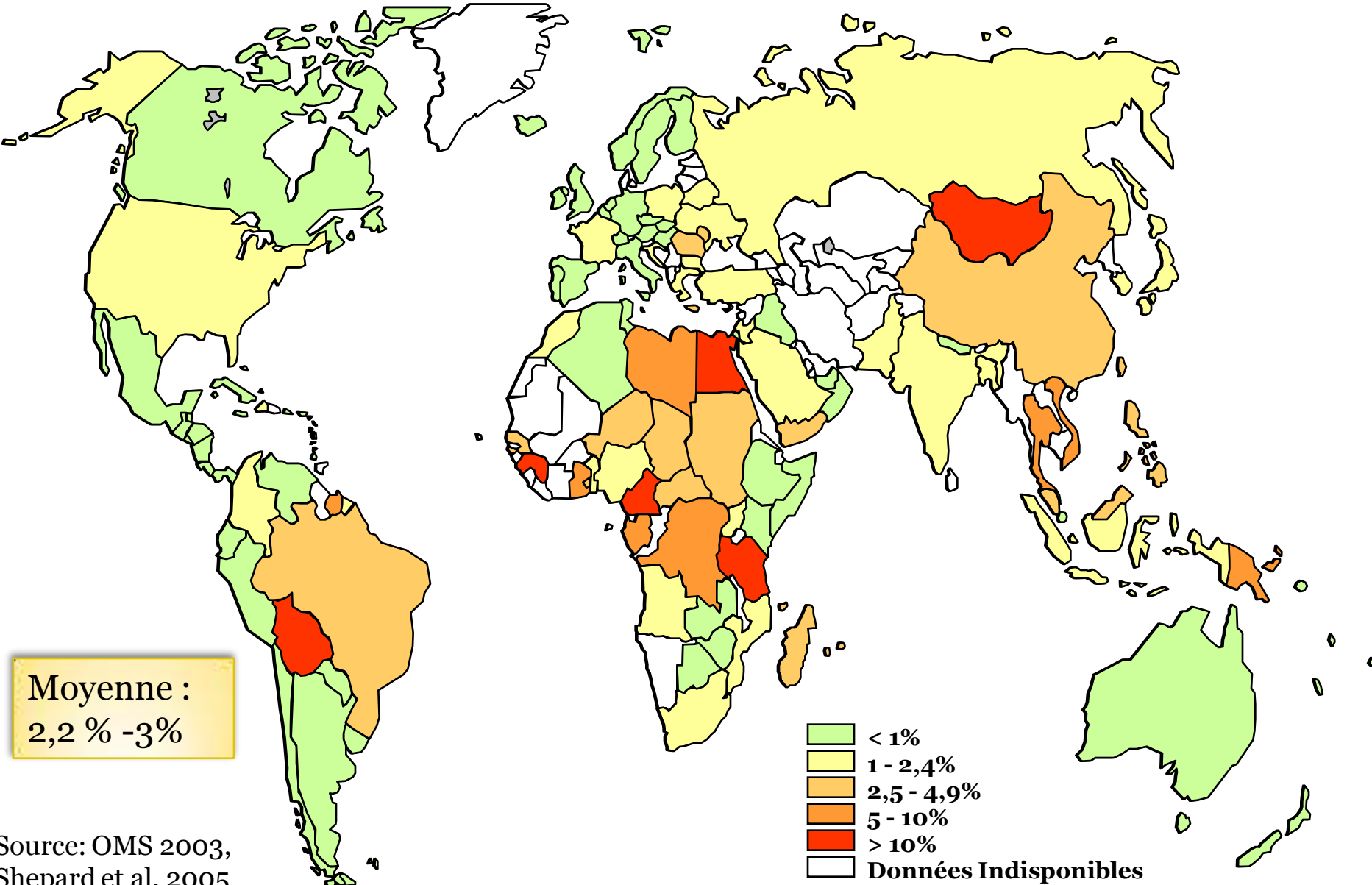
# Données Bibliographiques



# L'hépatite virale C

- Prévalence mondiale élevée
  - **170 millions** de porteurs chroniques dans le monde
  - A l'origine de **12 000** décès/an
  - Contribue à **20%** des cancers du foie
- Seuls 40% à 50% des porteurs sont identifiés
- Absence de vaccin préventif.

# Prévalence mondiale



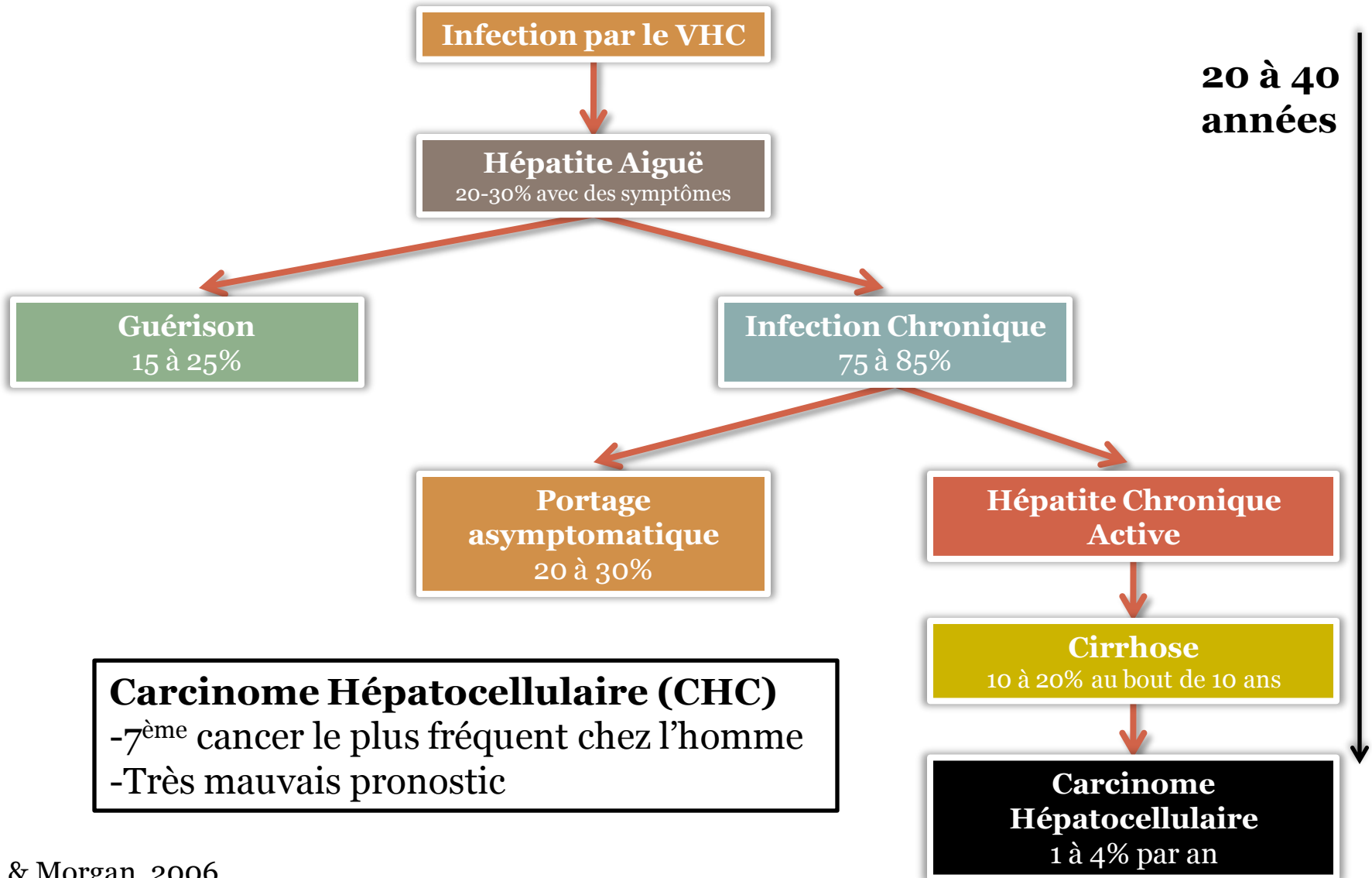
Moyenne :  
2,2 % - 3%

Source: OMS 2003,  
Shepard et al, 2005

## Modes de transmission

- Essentiellement **parentérale** dans les pays développés
  - Transmission nosocomiale
  - Transfusions sanguines
  - Toxicomanie
- Par **injections thérapeutiques** dans les pays en voie de développement
- Dans 20 % des cas, **non identifié**

# Histoire Naturelle de l'infection



# Classification phylogénétique

**Pestivirus**

Virus du Choléra du Porc      Virus de la Diarrhée Virale Bovine

0 0,1

Nombre de substitutions en acides aminés par site

**Flavivirus**

Famille des Flaviviridae

Fièvre Jaune

Dengue 1

Dengue 2

West Nile

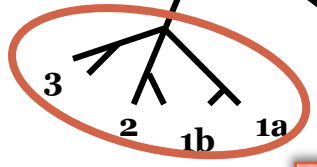
Encéphalite Japonaise

GBV-C/HGV

GBV-A

**Flavivirus non classés**

GBV-B



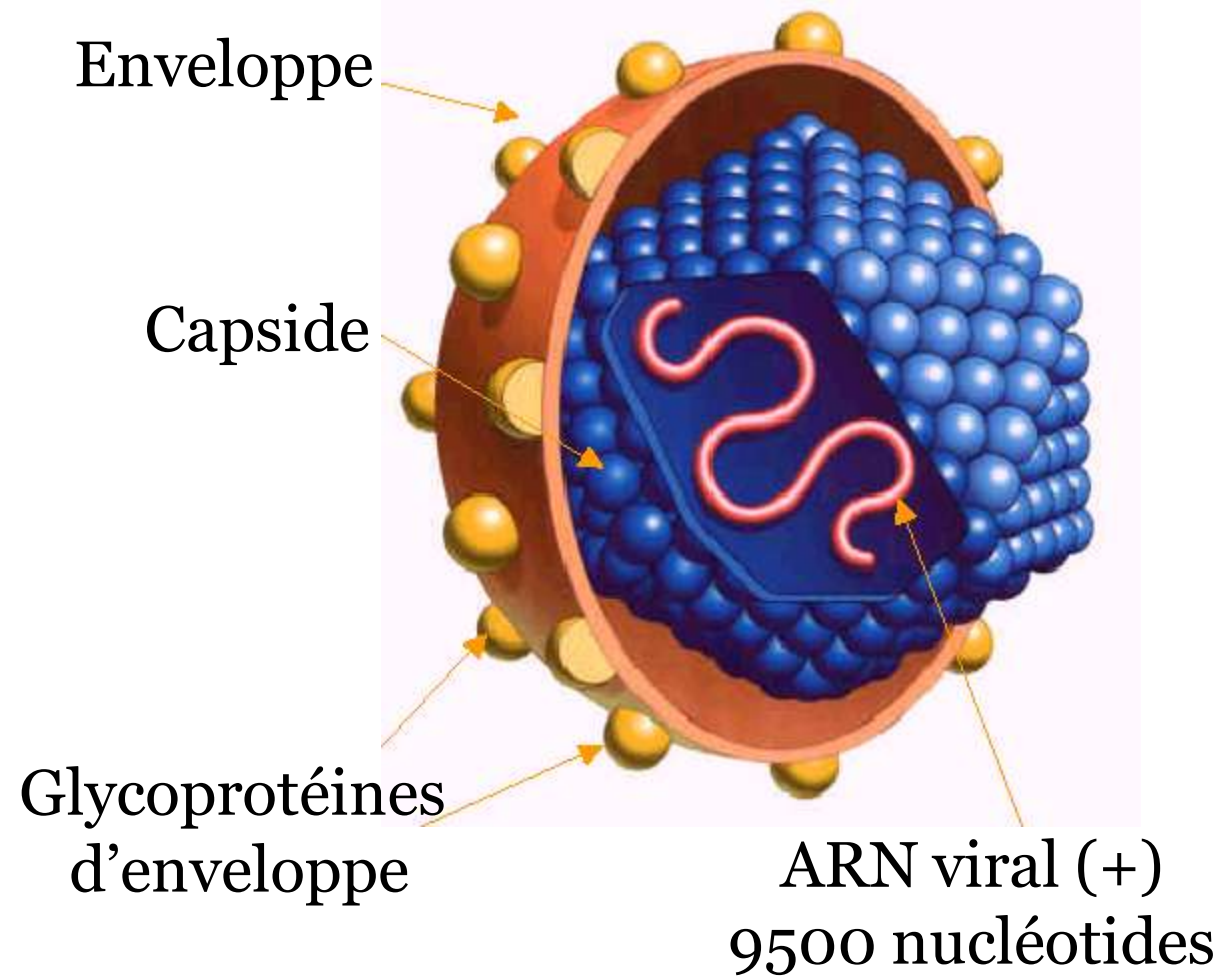
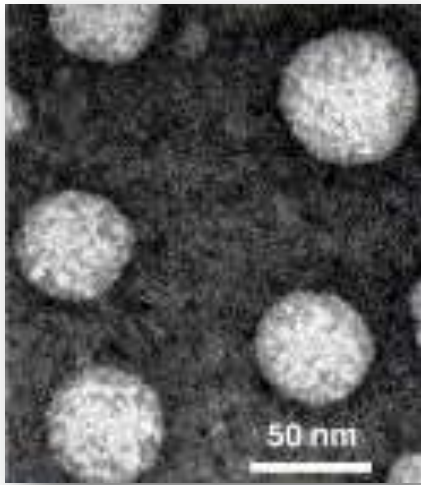
**VHC**

**Hepacivirus**

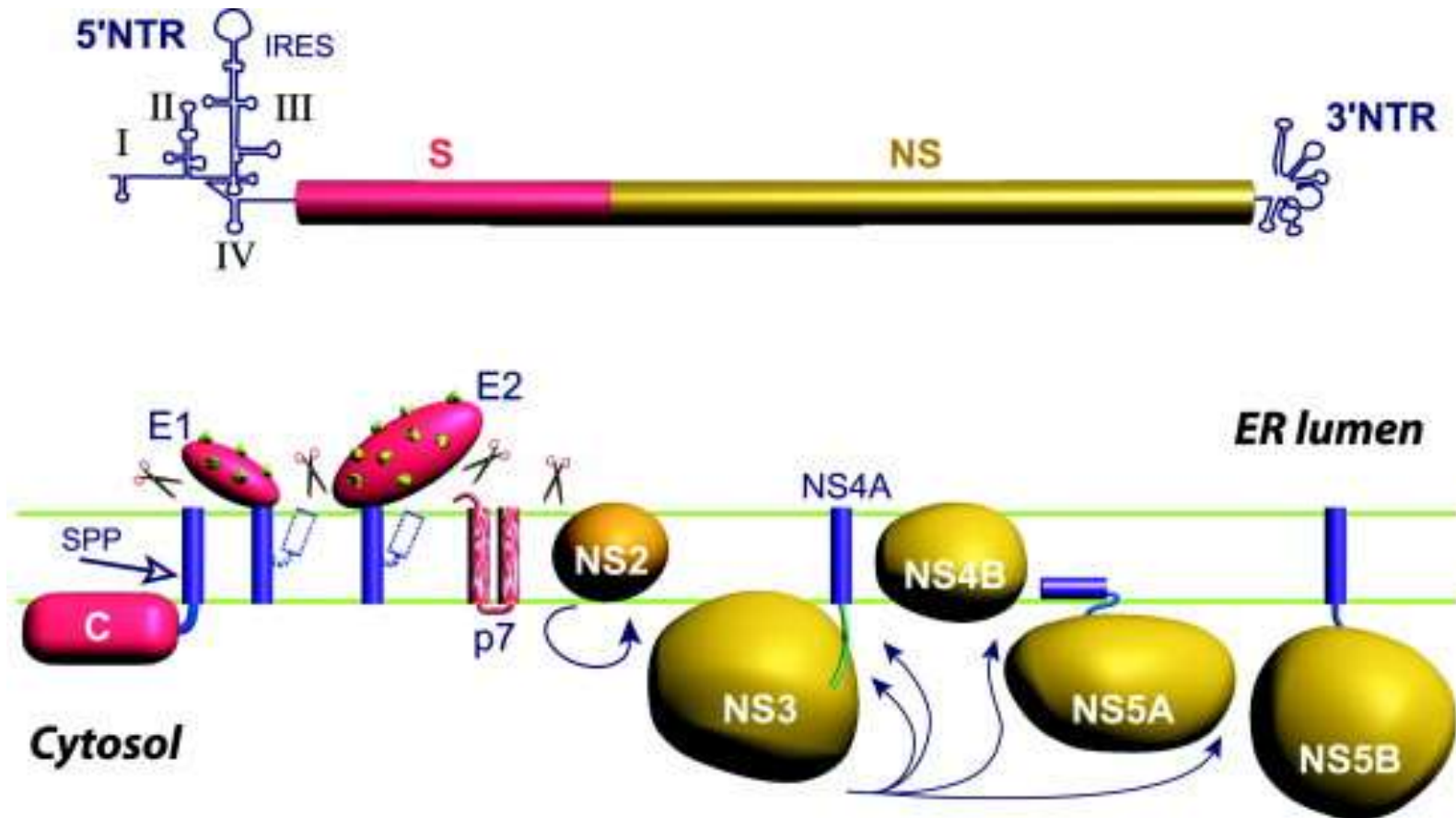
6 génotypes  
Plus de 100 sous-types  
Distribution en quasi espèces



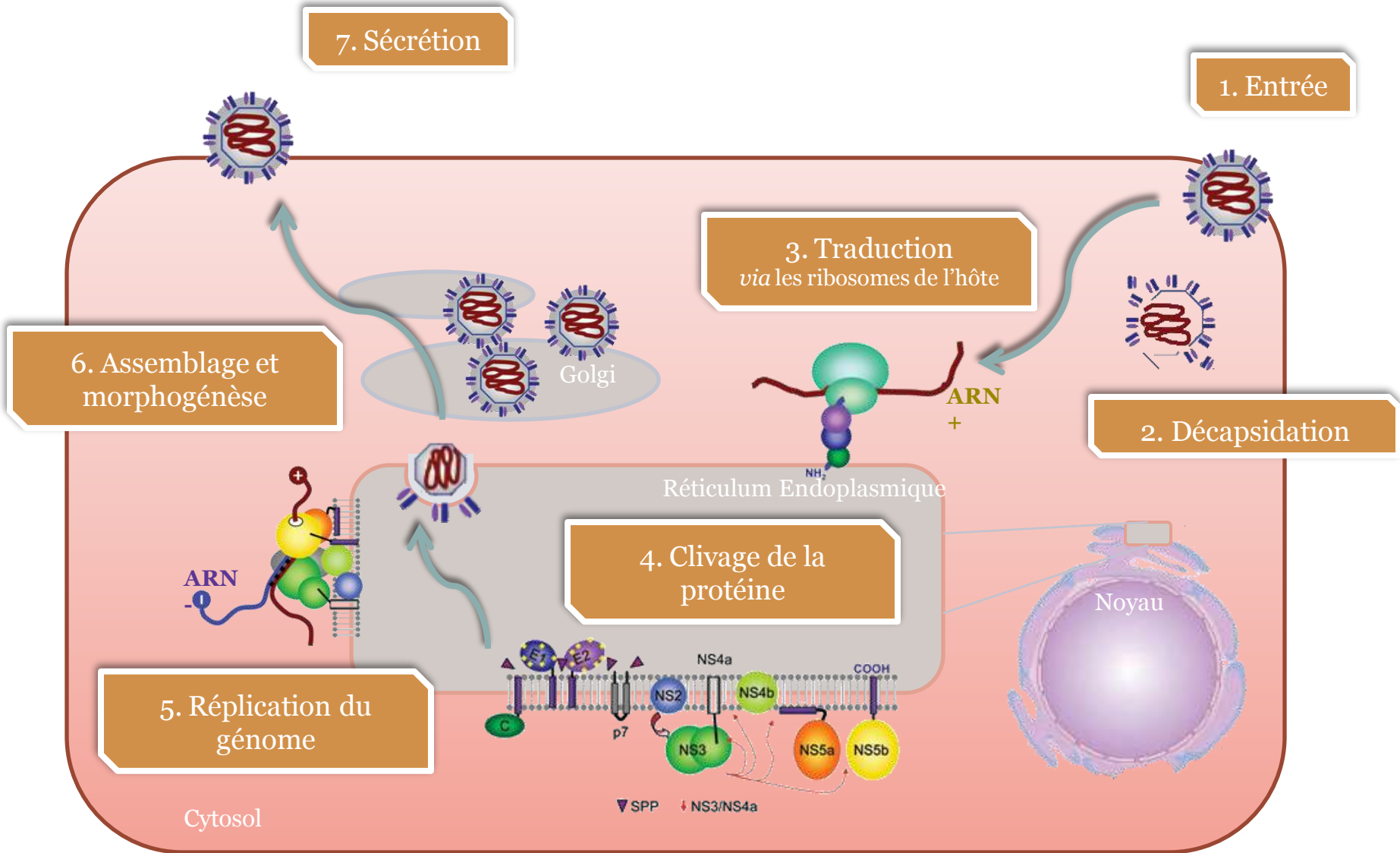
# Le Virus de l'hépatite C



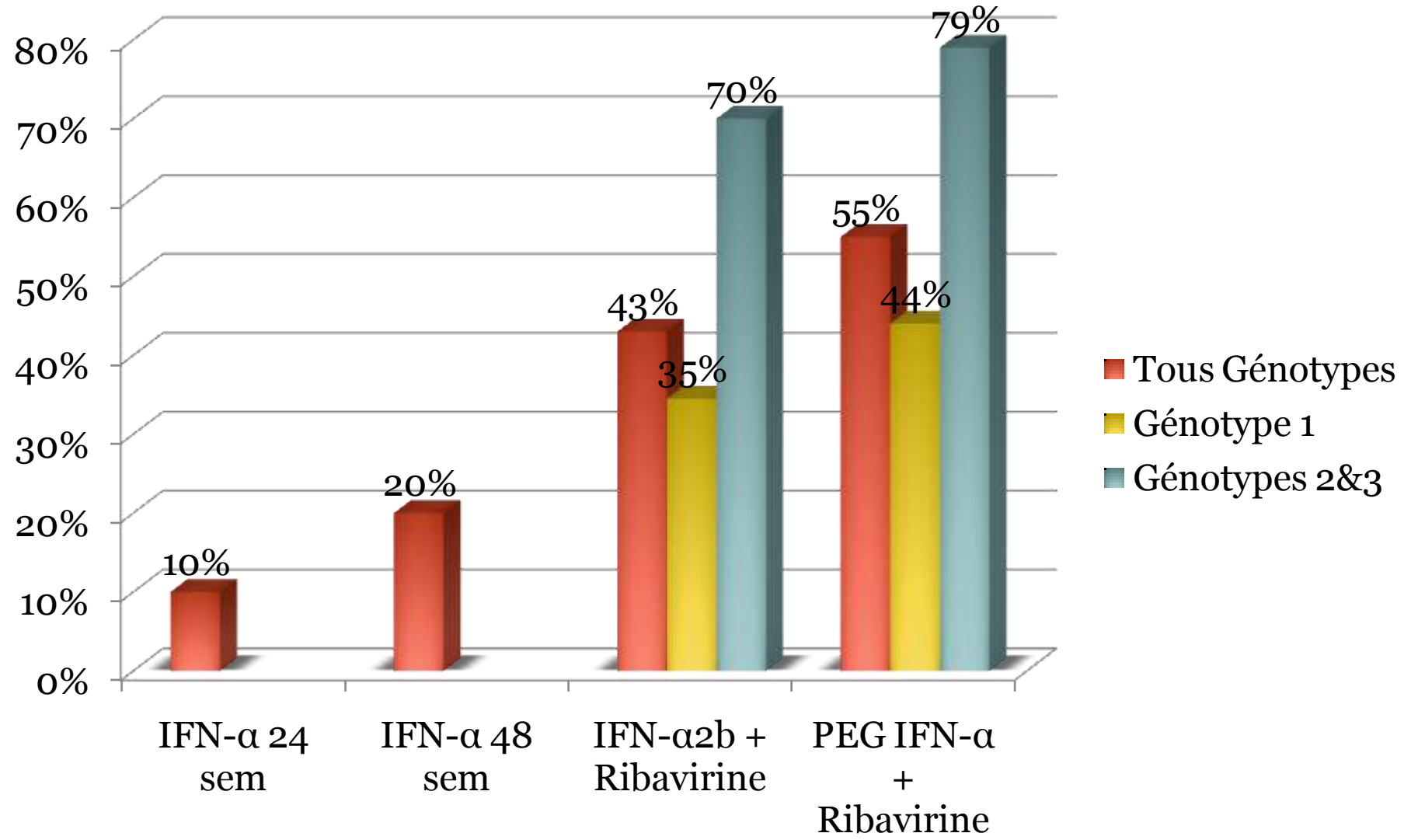
# Génome et protéines du VHC



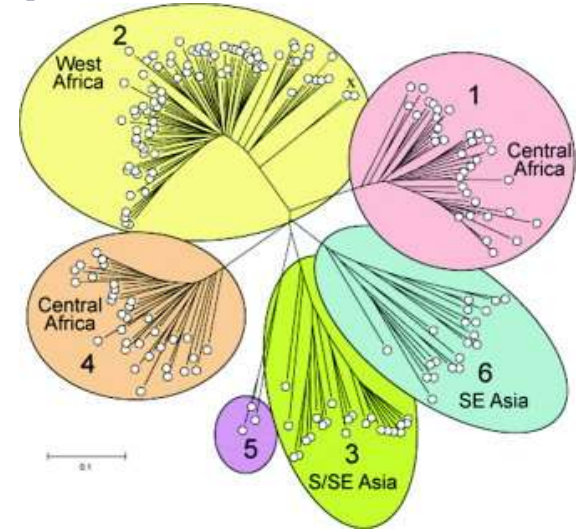
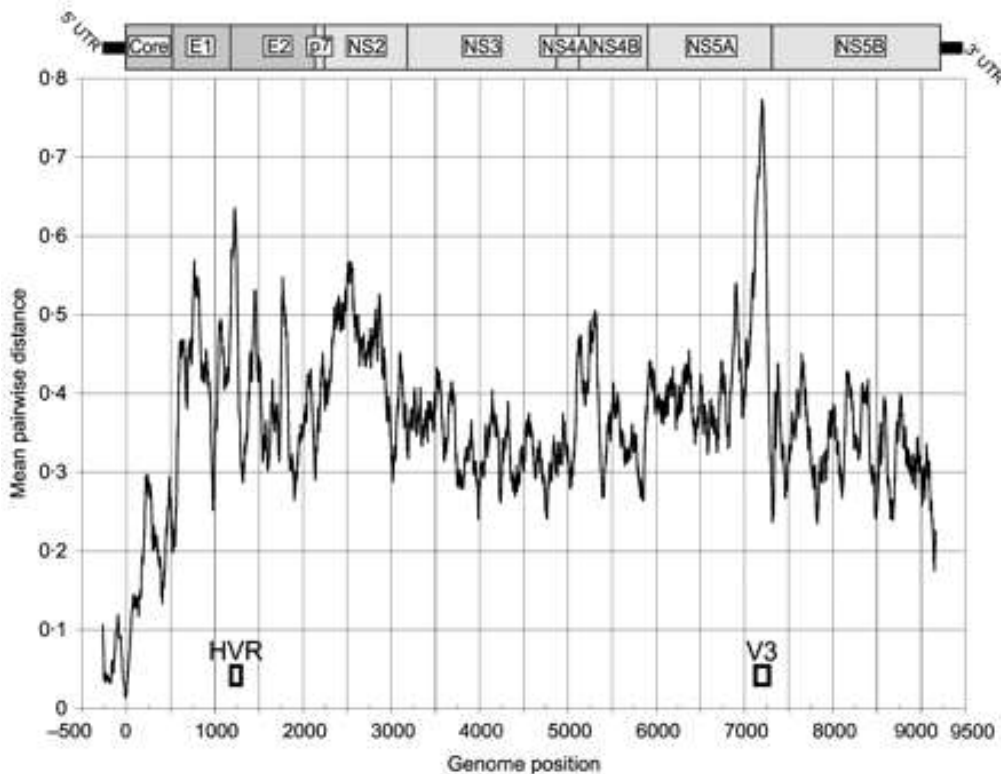
# Cycle viral



# Données cliniques de la bithérapie

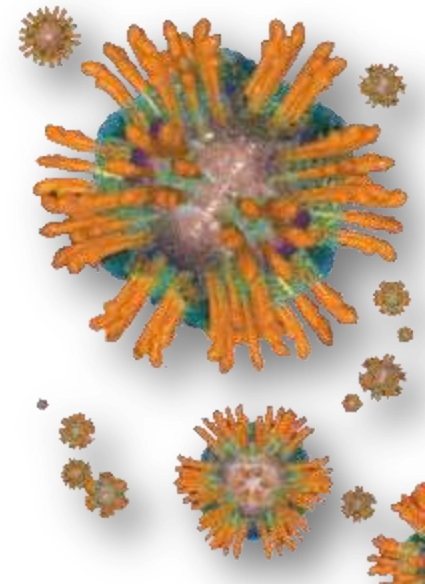


# Variabilité génétique



- Génération de **quasi-espèces** facilitant l'émergence de virus résistants aux traitements
- Variabilité répartie différemment sur le génome

# Objectifs des travaux



## Problématique

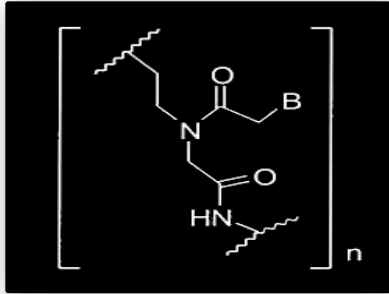
- Traitement actuel: association IFN- $\alpha$  pégylé et ribavirine
  - Encore inefficace dans de nombreux cas
  - Effets secondaires importants
- Arrivée prochaine des anti-protéases/anti-polymérase
  - Possible apparition de résistances du fait la grande variabilité génétique

**Le développement de nouvelles approches antivirales reste une priorité**



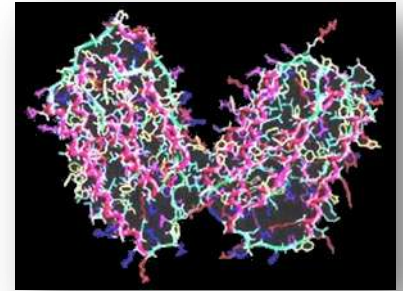
# Objectifs des travaux

## Molécules



Antisens  
de type  
PNA

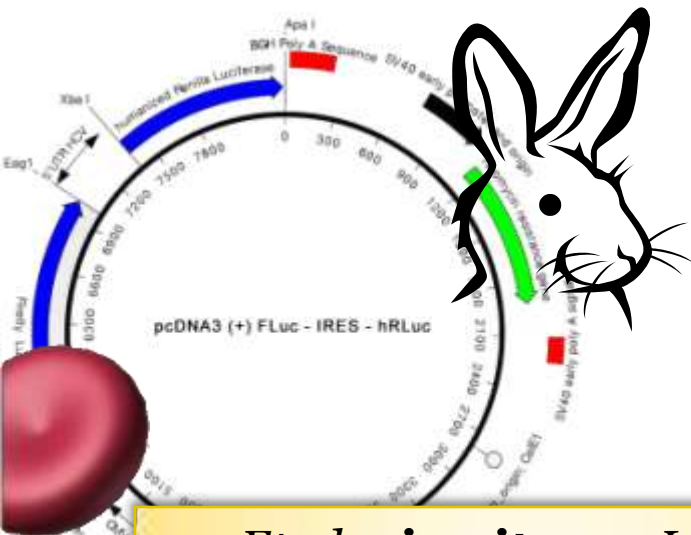
Nouveaux  
IFN- $\alpha$   
variants



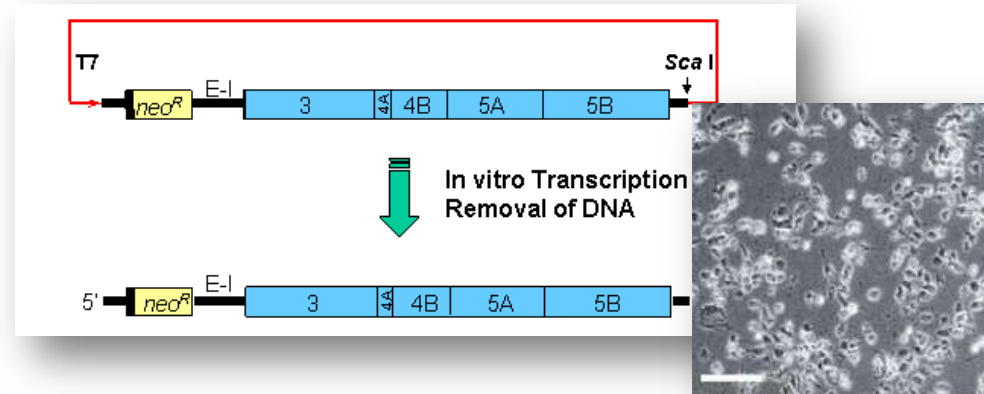
Collaboration LCBO Nice

Collaboration GenOdyssee

## Modèles



*Etudes in vitro en Lysat de  
Réticulocytes de Lapin*



*Etudes en culture de cellules  
Huh7 avec le réplikon VHC*

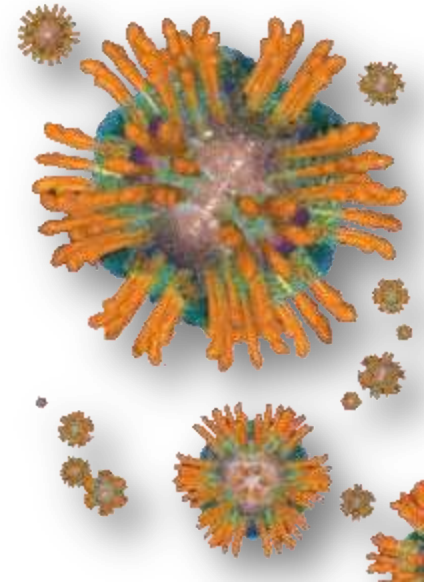


# Partie 1: Interférons - alpha variants

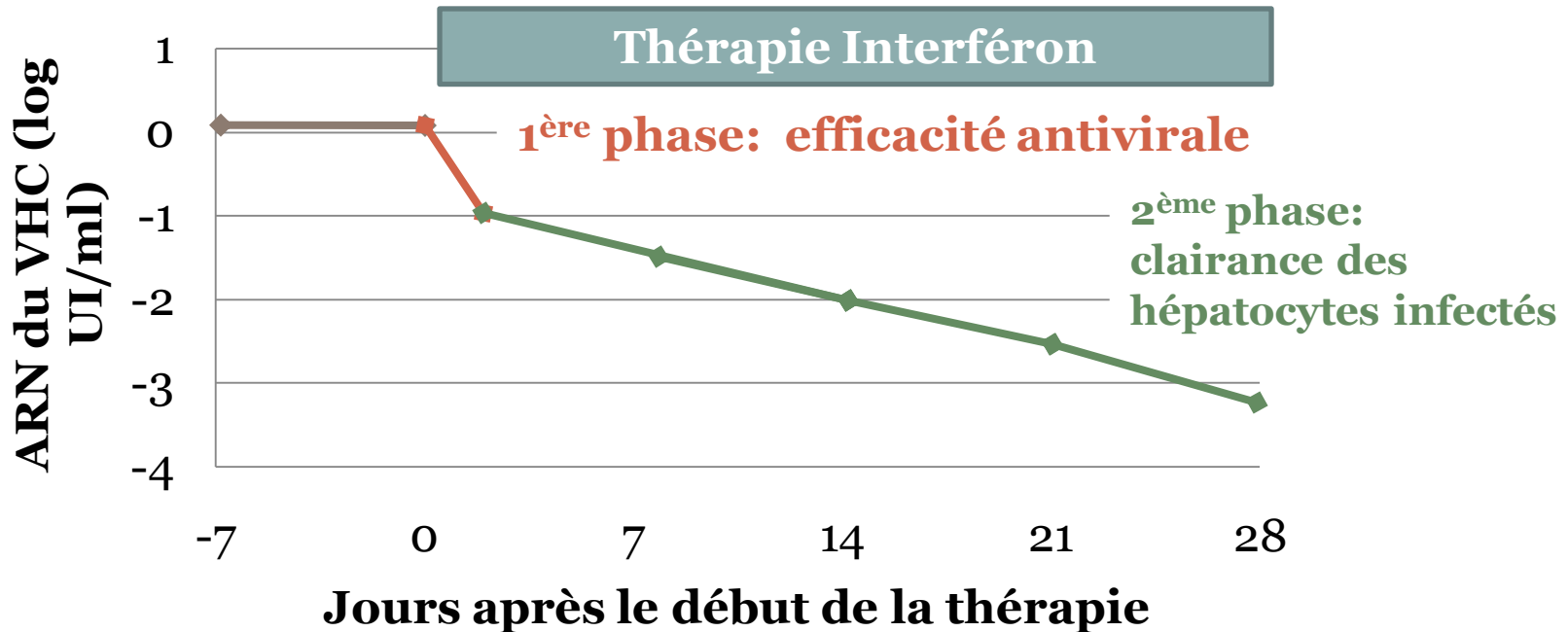
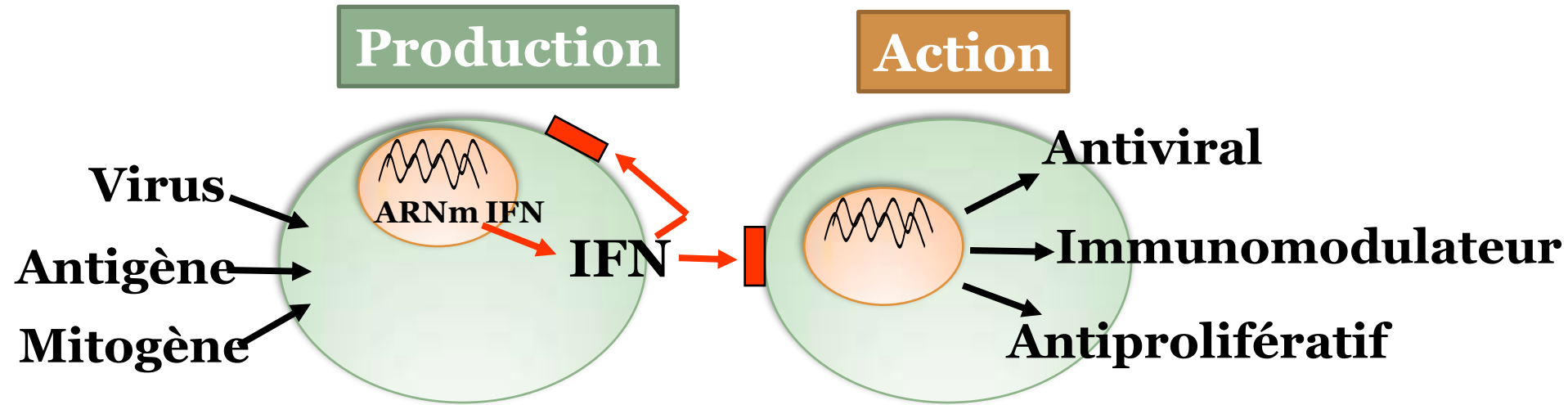
## **Novel interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) variant with improved inhibitory activity against HCV genotype 1 replication compared to IFN- $\alpha$ 2b therapy, in a subgenomic replicon system**

Vanessa Escuret, **Amaury Martin**, David Durantel, Romain Parent, Olivier Hantz, Christian Trépo, Thierry Menguy, Emmanuel Bottius, Jérôme Dardy, Jean Maral, Jean Louis Escary, Fabien Zoulim

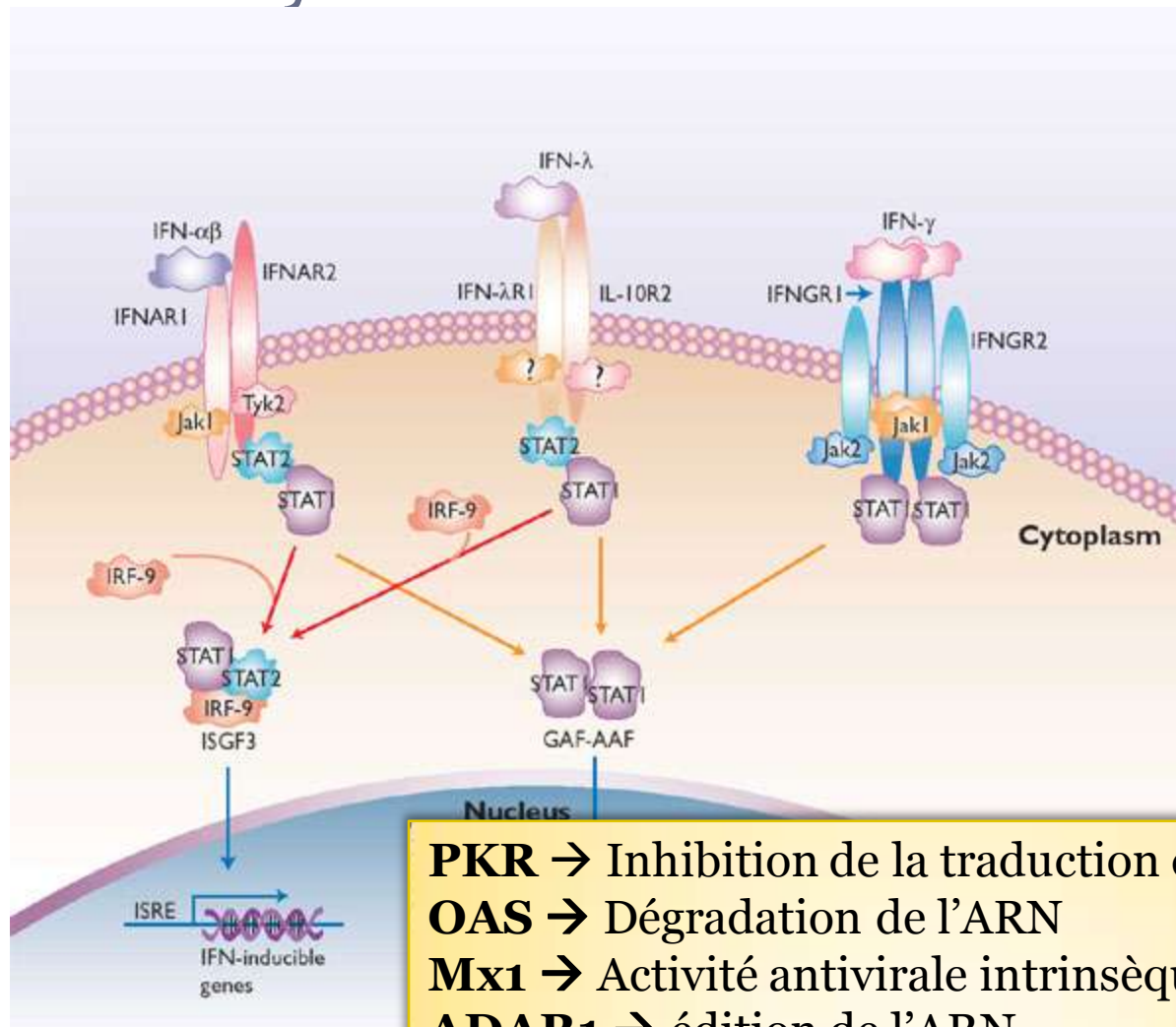
Publié en Décembre 2006 dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 50 No. 12 p.3984 – 3991



# Principe d'action de l'interféron- $\alpha$



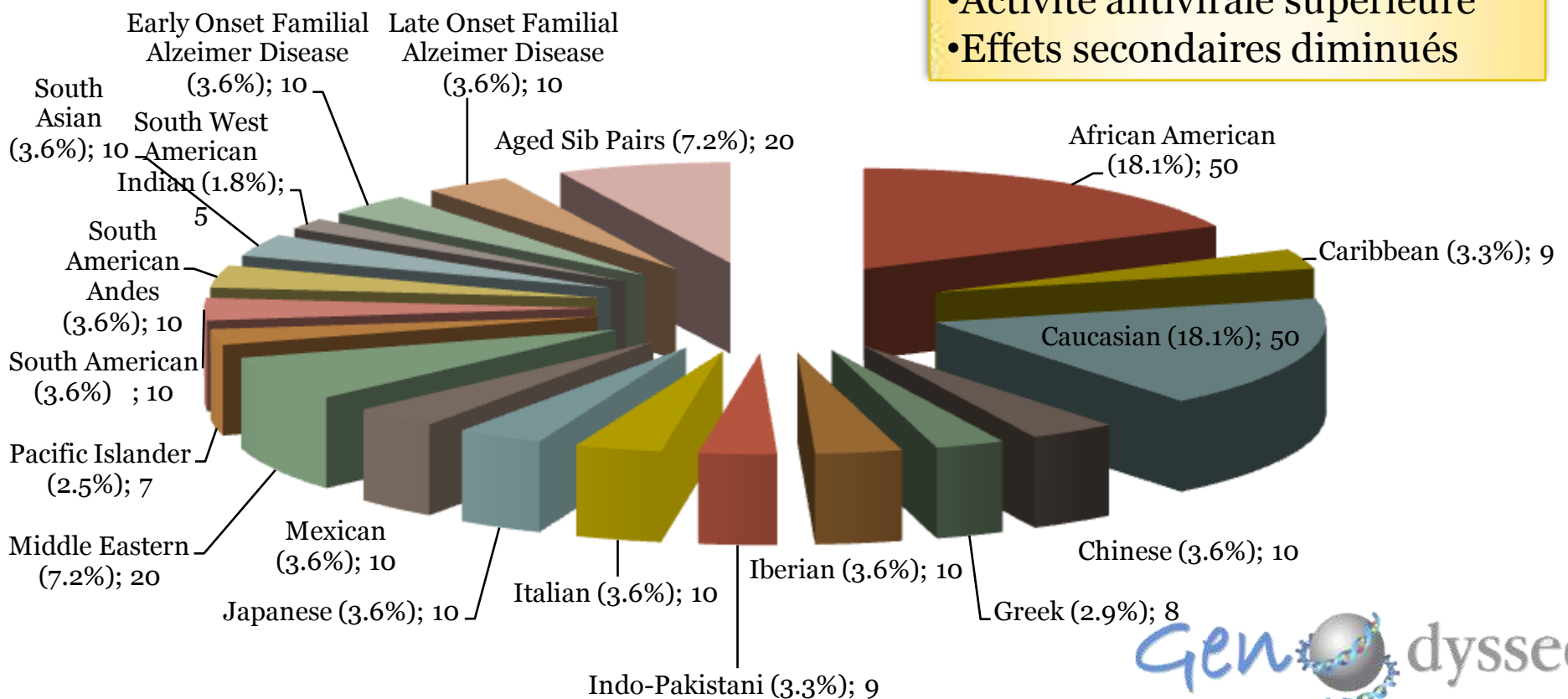
# Les interférons, une famille multigénique de cytokines inductibles



**PKR** → Inhibition de la traduction de l'ARNm  
**OAS** → Dégradation de l'ARN  
**Mx1** → Activité antivirale intrinsèque  
**ADAR1** → édition de l'ARN  
 ISG56, ISG15, ISG60, IFI6-16, etc...

# Le concept des IFN- $\alpha$ variants

- **Variabilité génétique fonctionnelle naturelle** des IFN- $\alpha$  au sein de la population humaine
- Echantillon de 239 individus représentant 85% de la diversité ethnique humaine



## Objectifs de l'étude

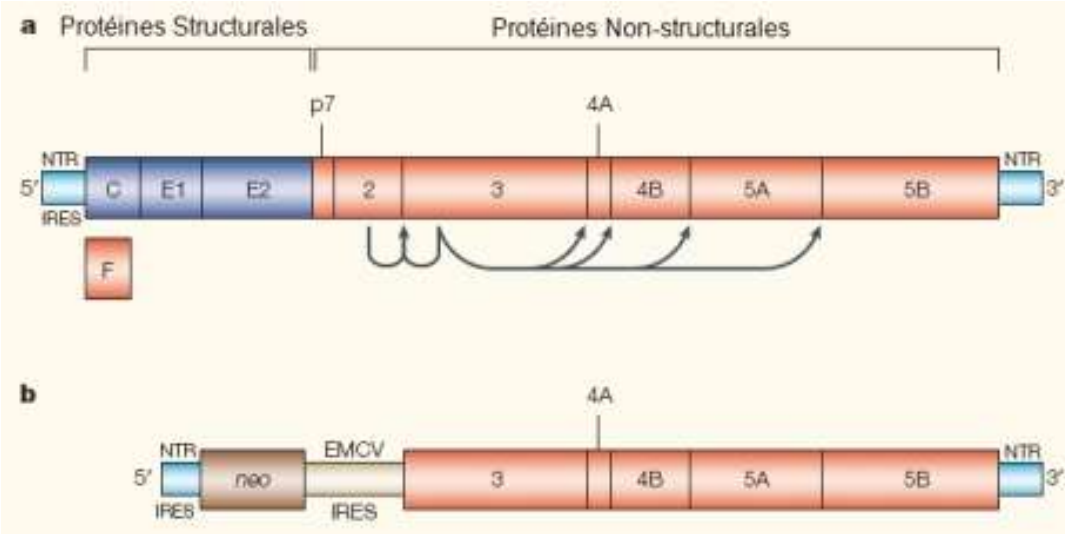
- 1. Comparaison de l'activité inhibitrice** des différents IFN- $\alpha$  variants dans le système des réplicons du VHC
- 2. Etude du mécanisme** d'action anti-VHC de l'IFN-  $\alpha$

# Les IFN- $\alpha$ variants testés

Numéro d'accession dans Swiss-Prot	gène IFN- $\alpha$ humain	Mutation	Protéine IFN- $\alpha$ variant
P01571	17	G45R	GEA007.1
P01567	7	D95N	GEA013.1
P01563	2b	Aucune	IFN- $\alpha$ -2WT
P01569	5	C122S	GEA011.1
P01568	21	K179E	GEA009.2

Mutants naturels comportant une mutation significative

# Méthodologie

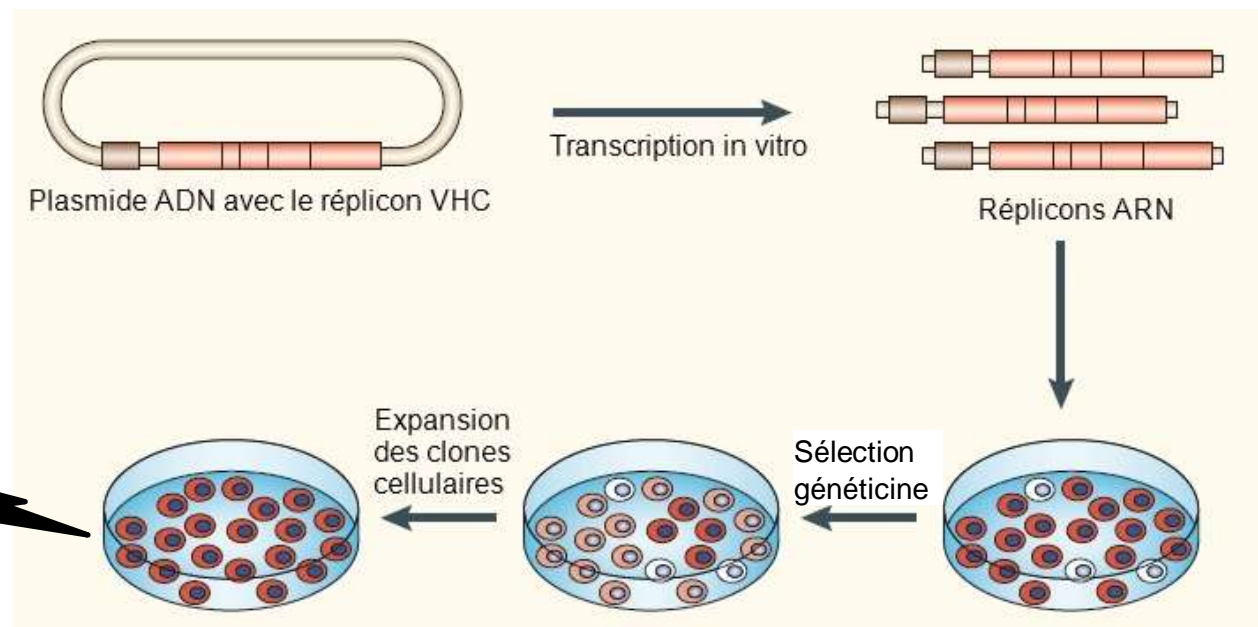


VHC

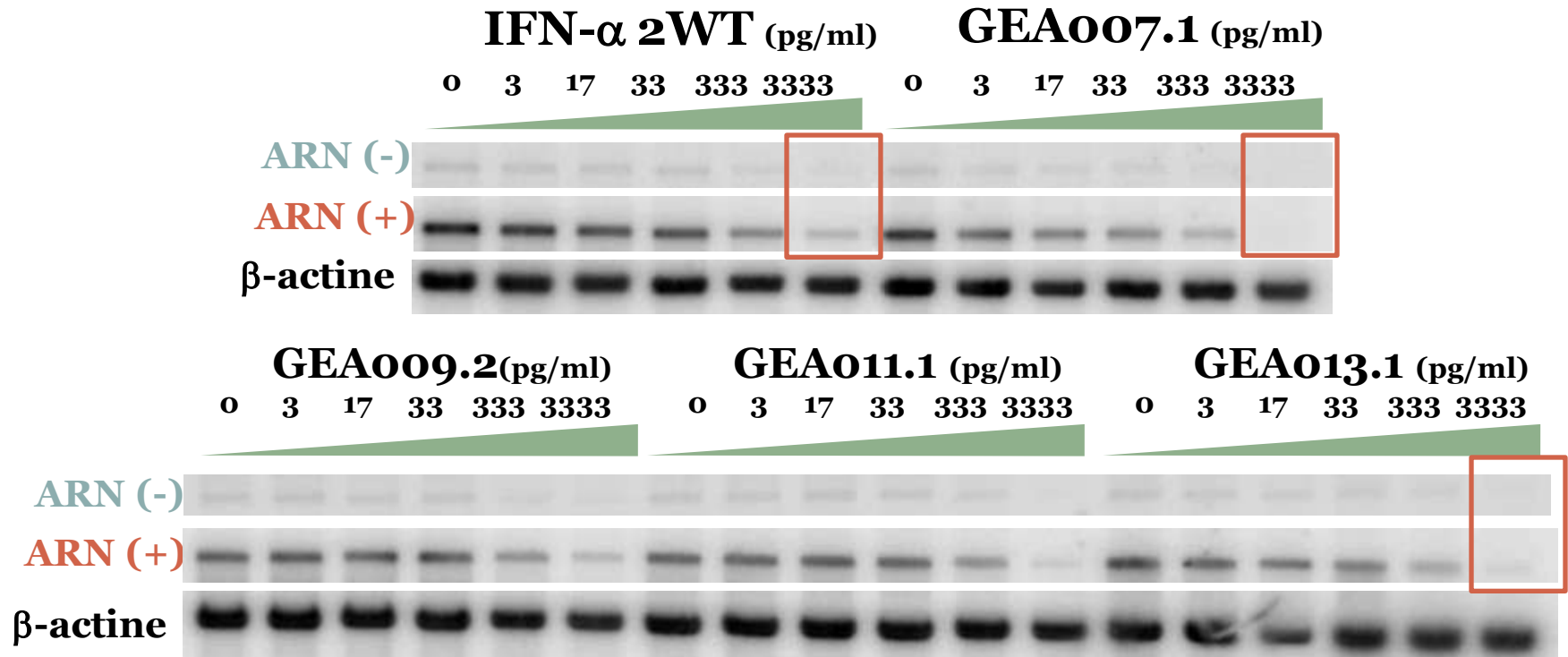
Réplicon VHC

Etablissement des clones contenant des réplicons VHC

IFN- $\alpha$  variants



# Activité inhibitrice des IFN- $\alpha$ variants



IFN	IC <sub>50</sub> (pg/mL)	IC <sub>90</sub> (pg/mL)	CC <sub>50</sub> (pg/mL)
IFN- $\alpha$ 2wt	<b>154.2 ± 8.8</b>	3080 ± 406	>> 3333
GEA007.1	<b>22.7 ± 9.4</b>	471 ± 276	>> 3333
GEA009.2	483.3 ± 86.6	> 3333	>> 3333
GEA011.1	187.9 ± 57.5	> 3333	>> 3333
GEA013.1	<b>95.6 ± 86.6</b>	2156 ± 300	>> 3333

Meilleure activité  
inhibitrice de  
GEA007.1

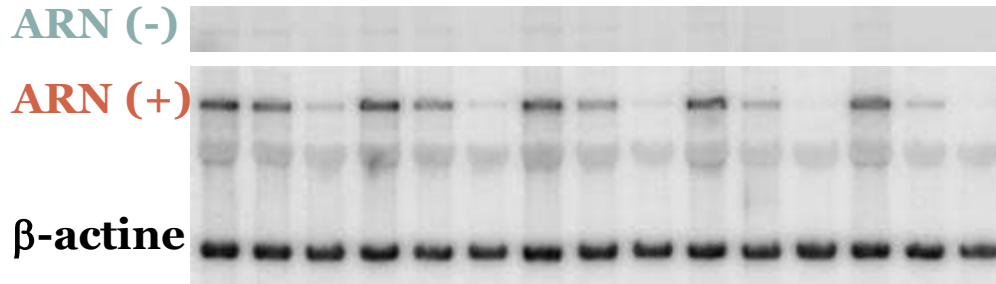


# Effet d'un traitement prolongé

## Arrêt du traitement par IFN- $\alpha$

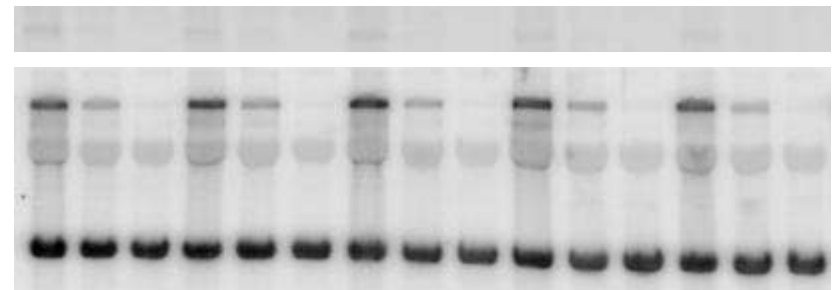
IFN- $\alpha$  2wt ou GEA007.1 333pg/ml  
milieu sans Généticine

P1 P2 P3 P4 P5  
o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1



milieu sans Généticine

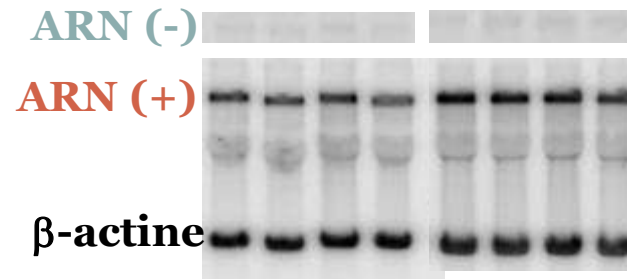
P6 P7 P8 P9 P10  
o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1 o 2wt 7.1



Le traitement prolongé des cellules par GEA007.1 permet l'élimination précoce du réplicon VHC

milieu avec Généticine

P6 P7 P8 P9  
o 2wt o 2wt o 2wt o 2wt

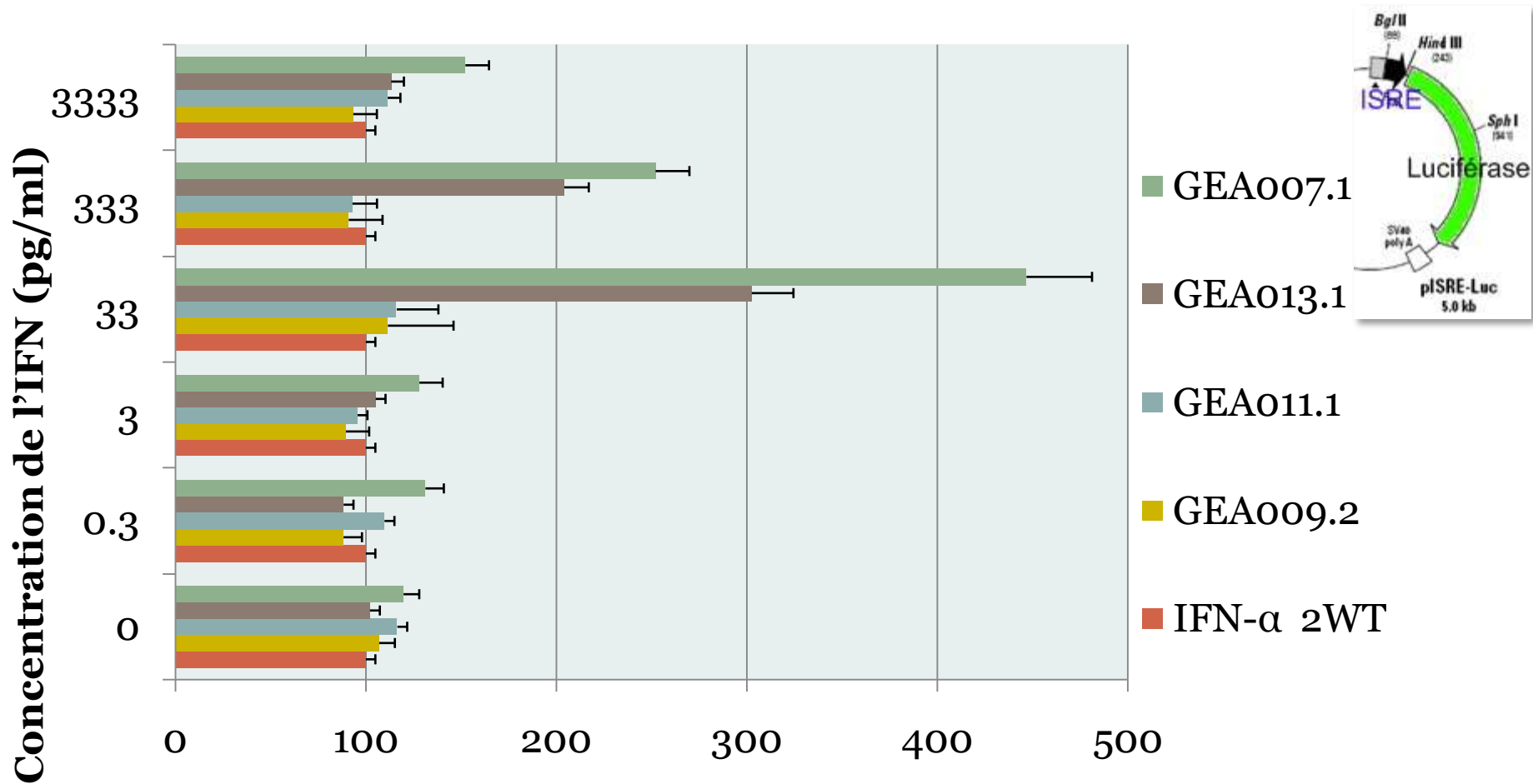


GEA007.1



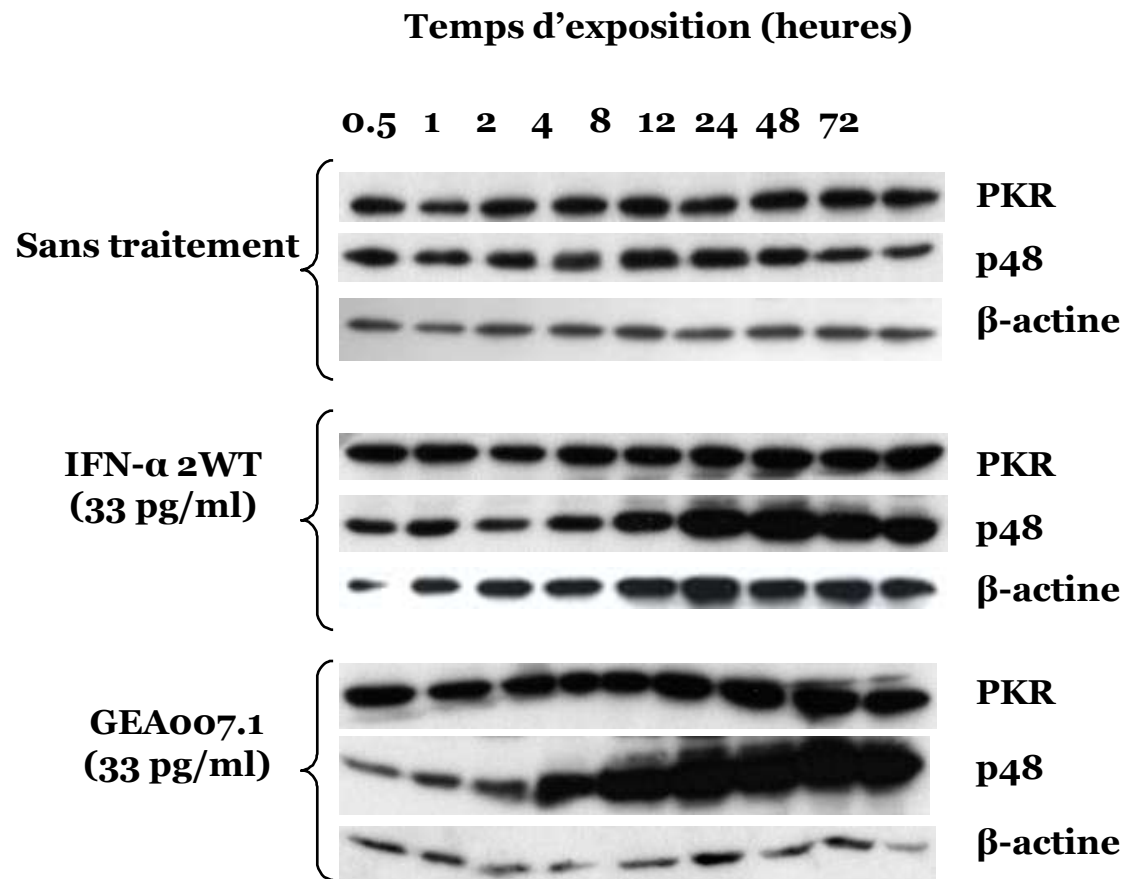
Mort cellulaire

# Différences d'induction des voies de réponse à l'IFN



GEA007.1 semble avoir une affinité supérieure pour le récepteur à l'IFN

# Effet de GEA0007.1 sur l'expression de PKR et de p48



GEA007.1 induit plus fortement la transduction du signal associé à l'interféron

# Induction des gènes (array)

Nom du gène	IFN- $\alpha$ 2WT 33pg/ml pdt 8heures	GEA007.1 33pg/ml pdt 8heures
<b>MX1</b>	17.83	<b>25.92</b>
<b>ISG-56</b>	2.055	4.455
<b>ISG-15</b>	1.7	4.125
<b>ISG-60</b>	1.27	3.985
<b>ADAR</b>	1.38	<b>2.91</b>
<b>KIAA1268</b>	1.19	2.35
<b>IFI6-16</b>	0.795	2.13
<b>STAT1</b>	1.38	2.08
<b>MAPKK1/MEK1</b>	0.65	1.72
<b>PKR</b>	0.89	<b>1.535</b>
<b>P48/IRF-9</b>	0.82	<b>1.365</b>

Meilleure transduction du signal par GEA007.1

## Conclusion

- **Inhibition plus efficace** par GEA007.1 de la synthèse d'ARN du VHC dans le modèle réplicon.
- Activité inhibitrice supérieure du GEA007.1 corrélée à une meilleure **induction des voies de transduction** des IFN de type I par la voie Jak-STAT
- Meilleure **affinité** au récepteur ?

## Perspectives

- **Etudes d'affinité** entre GEA007.1 et le récepteur aux IFN de type I.
- Evaluation de l'activité de GEA007.1 dans le **système de réplication complet du VHC (JFH1)**
- Evaluation de formes « retard » dans l'optique d'une **utilisation clinique.**

## Partie 2: *Peptide Nucleic Acids*

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

**Amaury Martin**, David Durantel, Sergio A. Caldarelli, Christine Alotte, Audrey Di Giorgio, Nadia Patino, Roger Condom, Fabien Zoulim, and Olivier Hantz

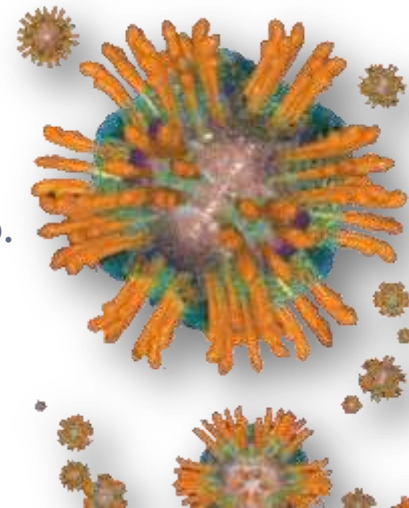
Soumis pour publication en Décembre 2006 dans [Antiviral Research](#).

---

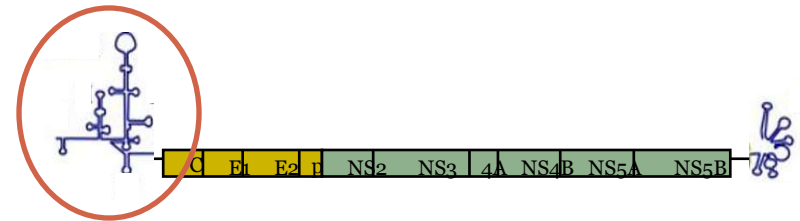
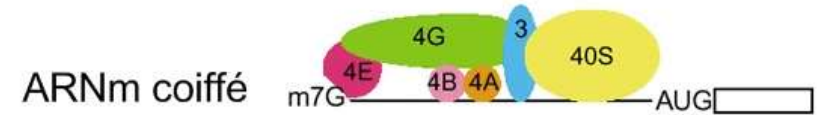
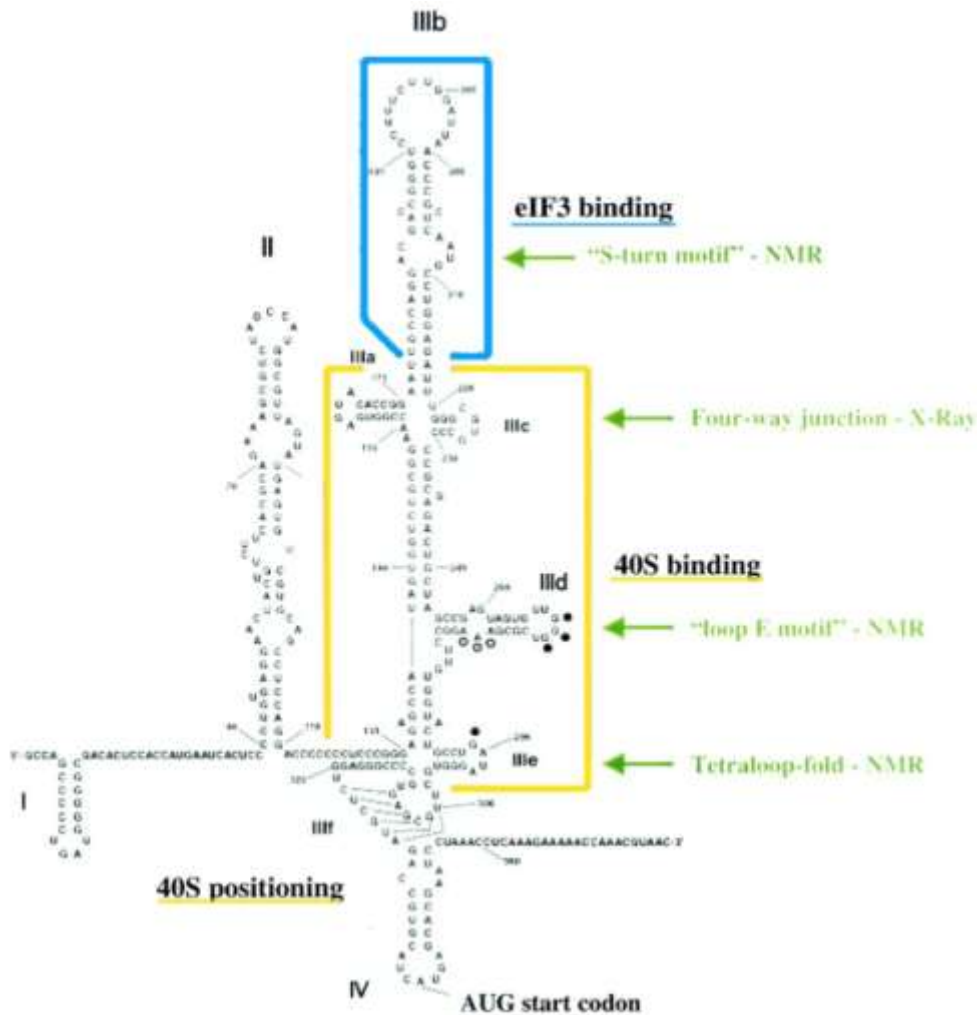
### **A Cyclic PNA-based Compound Targeting Domain IV of HCV IRES RNA Inhibits in vitro IRES-Dependent Translation.**

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

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



# IRES: Site Interne d'Entrée du Ribosome

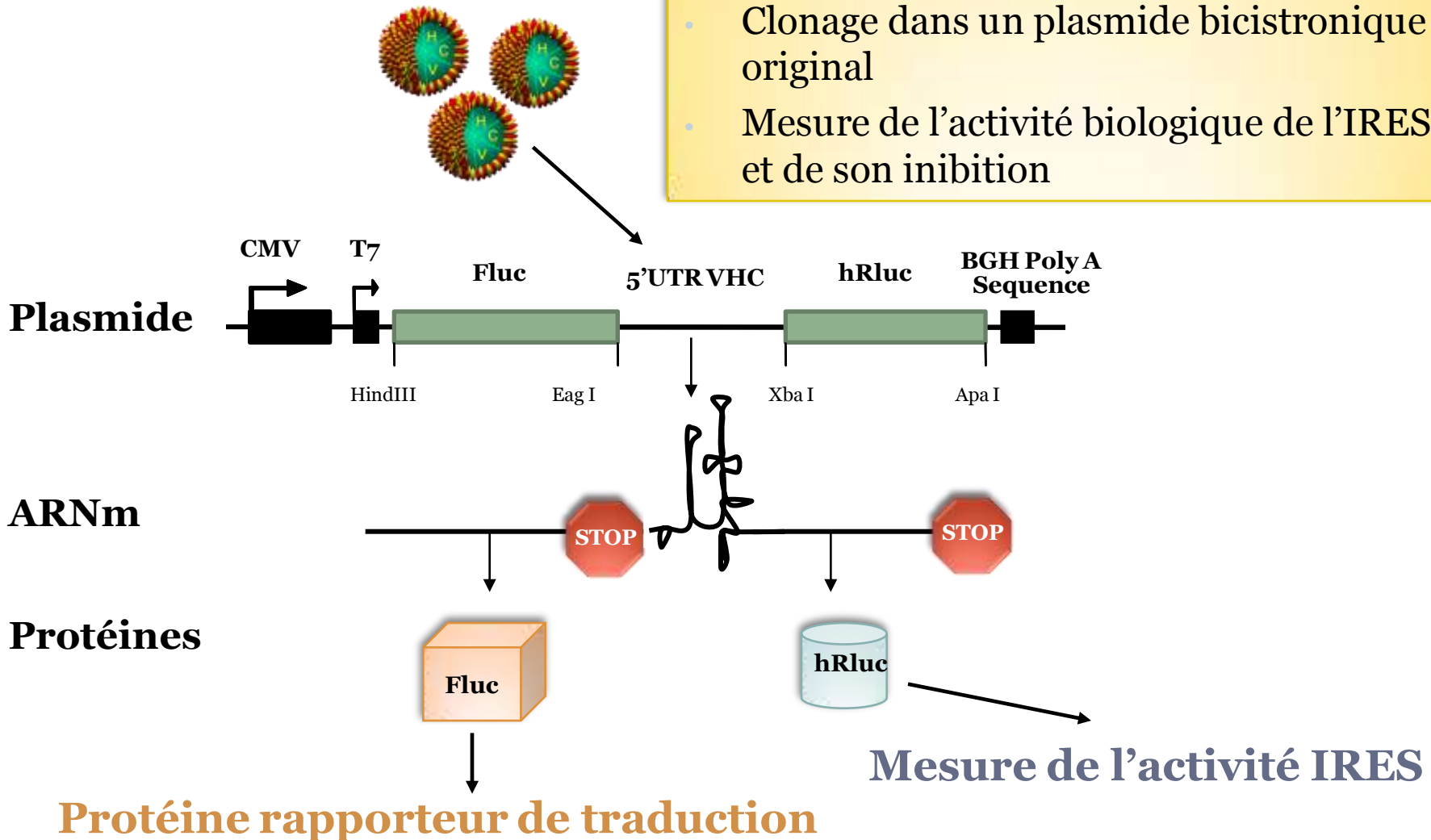


- ARN structuré
- Initiation de la traduction à la place d'une initiation dépendante de la coiffe
- Aucune modification nucléotidique autorisée dans les régions clés



# Méthodologie

- Amplification RT-PCR des IRES à partir d'isolats cliniques
- Clonage dans un plasmide bicistronique original
- Mesure de l'activité biologique de l'IRES et de son inhibition

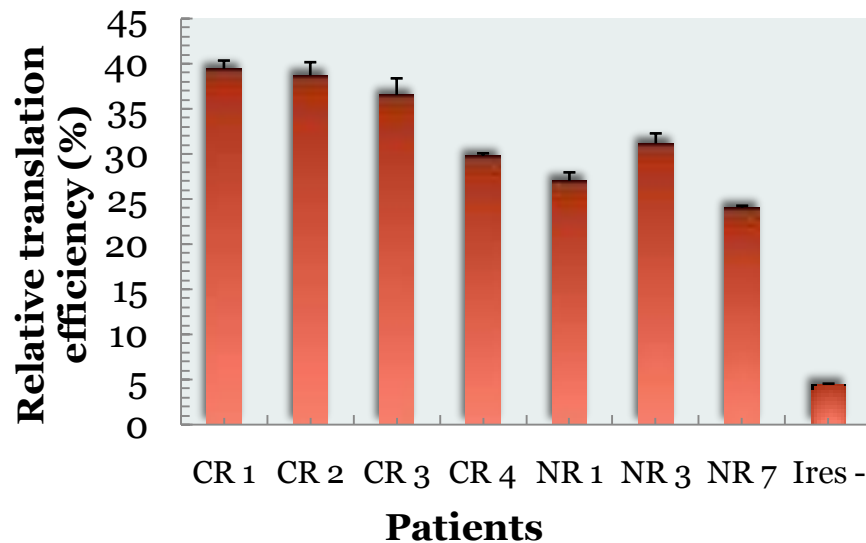


# Activité des IRES

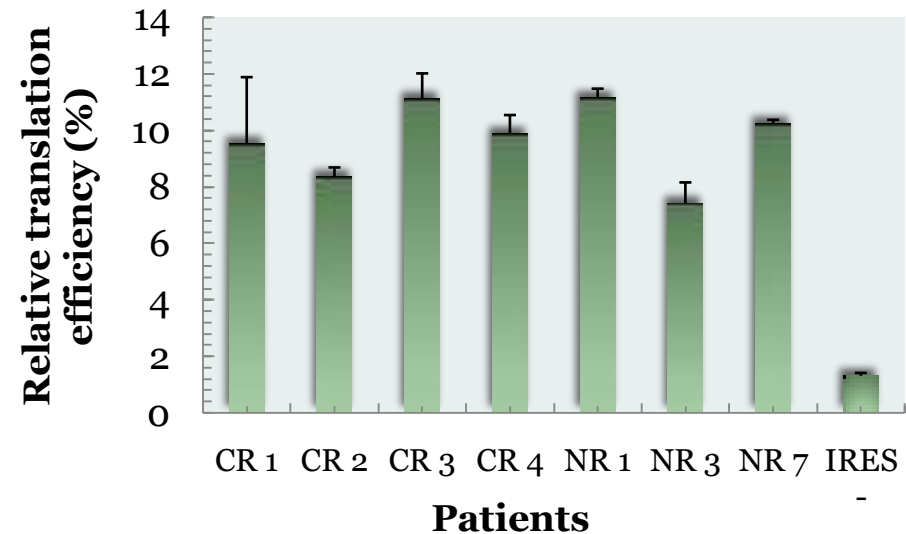
## 9 patients :

- Infectés chroniquement
- Sous traitement IFN $\alpha$ - Ribavirine
- Génotypes 1
- 4 répondeurs complets et 5 non-répondeurs

Expériences de transfection transitoire



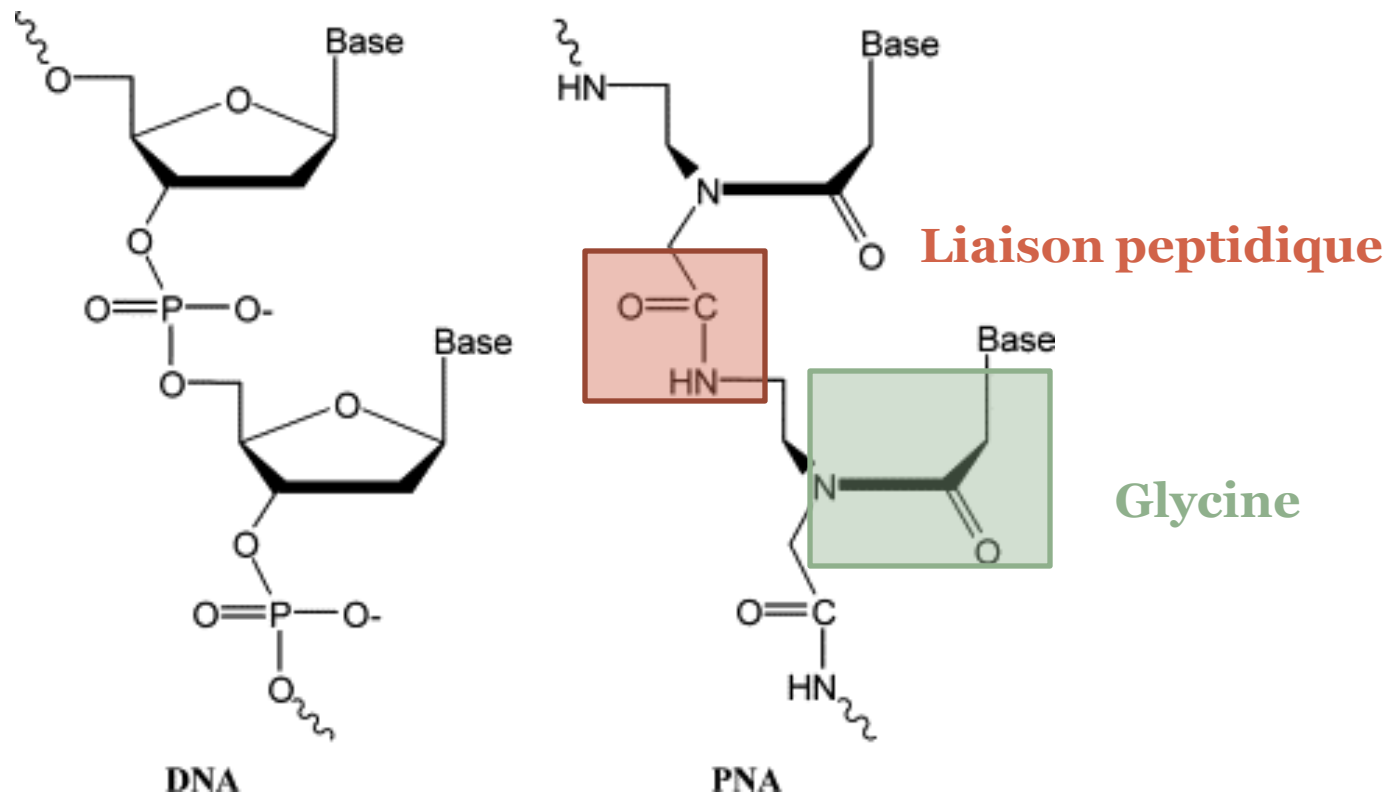
*Essais en systèmes acellulaire  
(Système de Lysat Réticuocytaire)*



*Culture Hépatocellulaire humaine  
(HuH7)*

Intérêt de l'IRES comme cible d'antisens

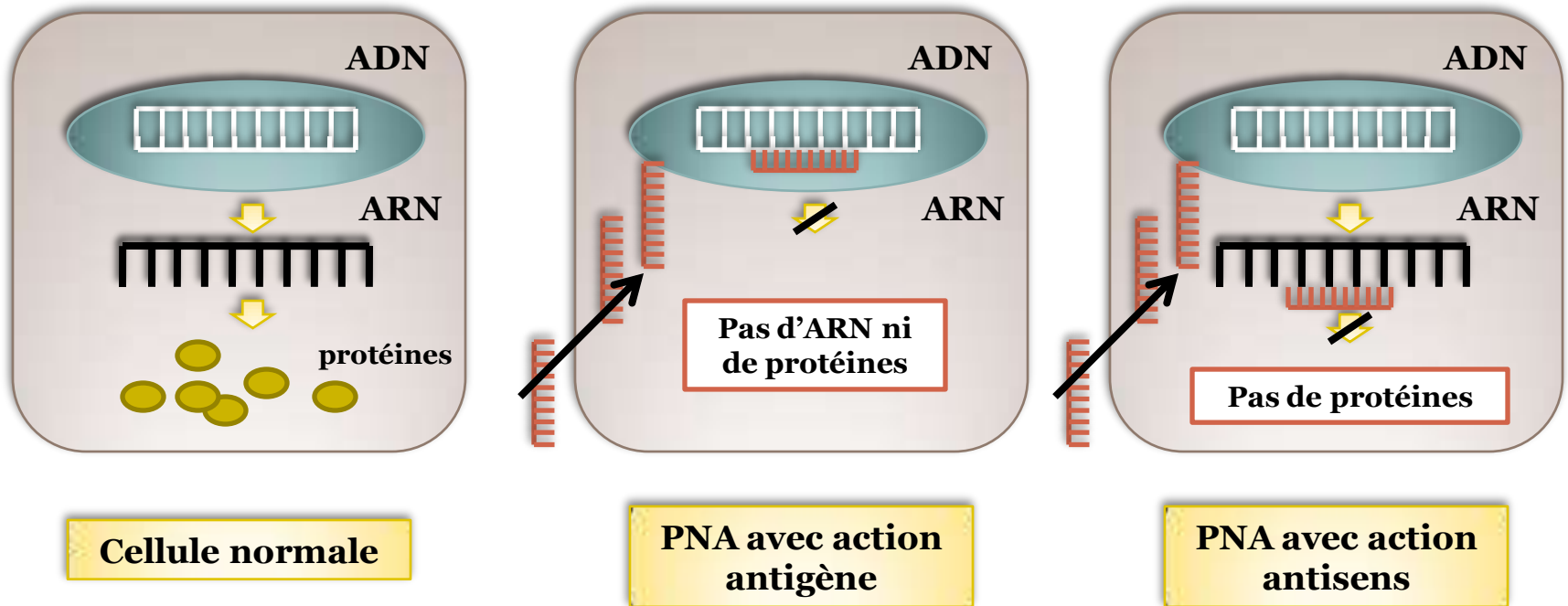
# PNA : Peptide Nucleic Acids



Structure synthétique développée par **P. Nielsen**, 1991  
Antisens de 3<sup>ème</sup> génération

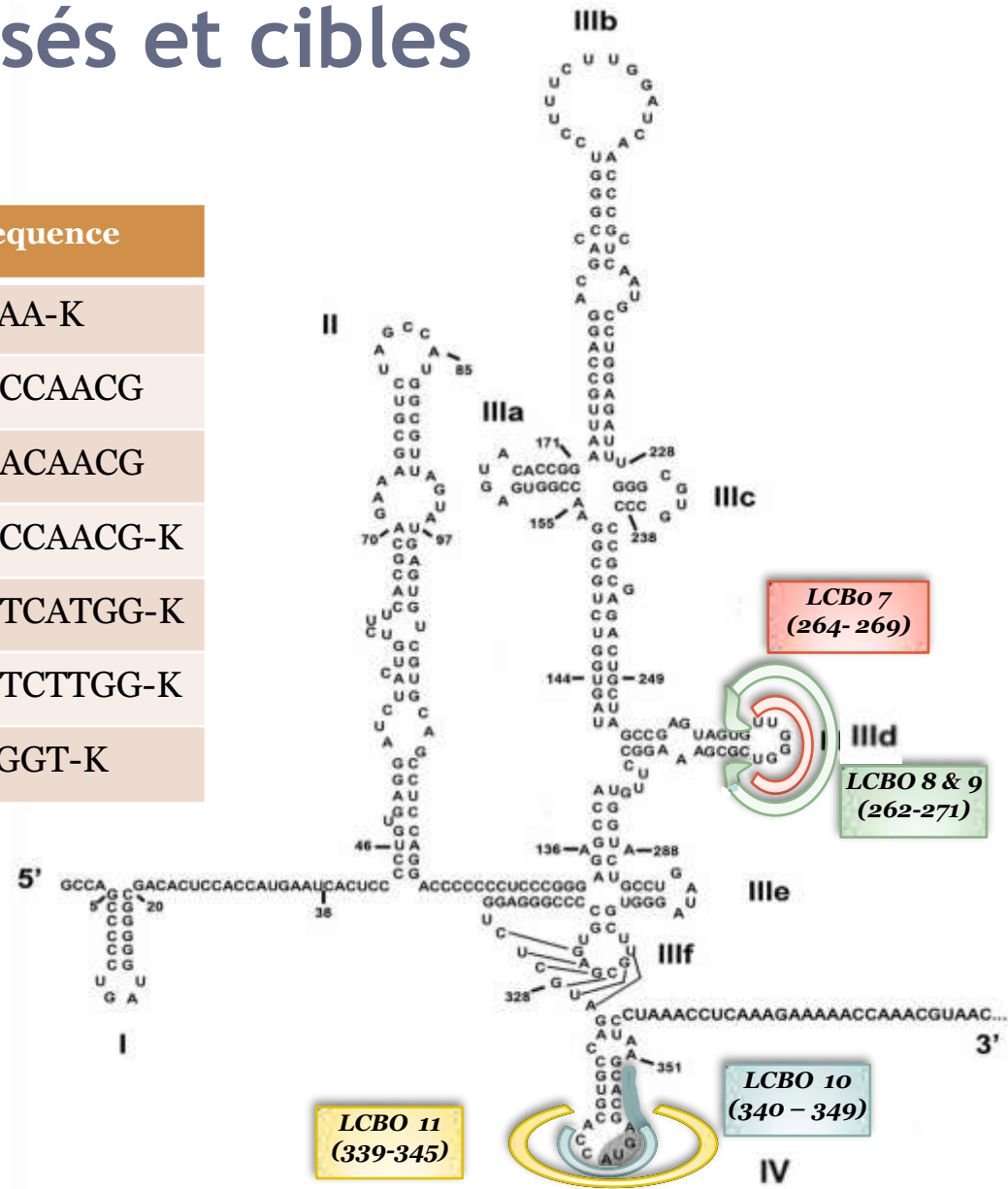
# Propriétés des PNA

- Résistants à la dégradation par les nucléases
- Stabilité pH
- Liaison forte aux acides nucléiques simple-brin et double-brin



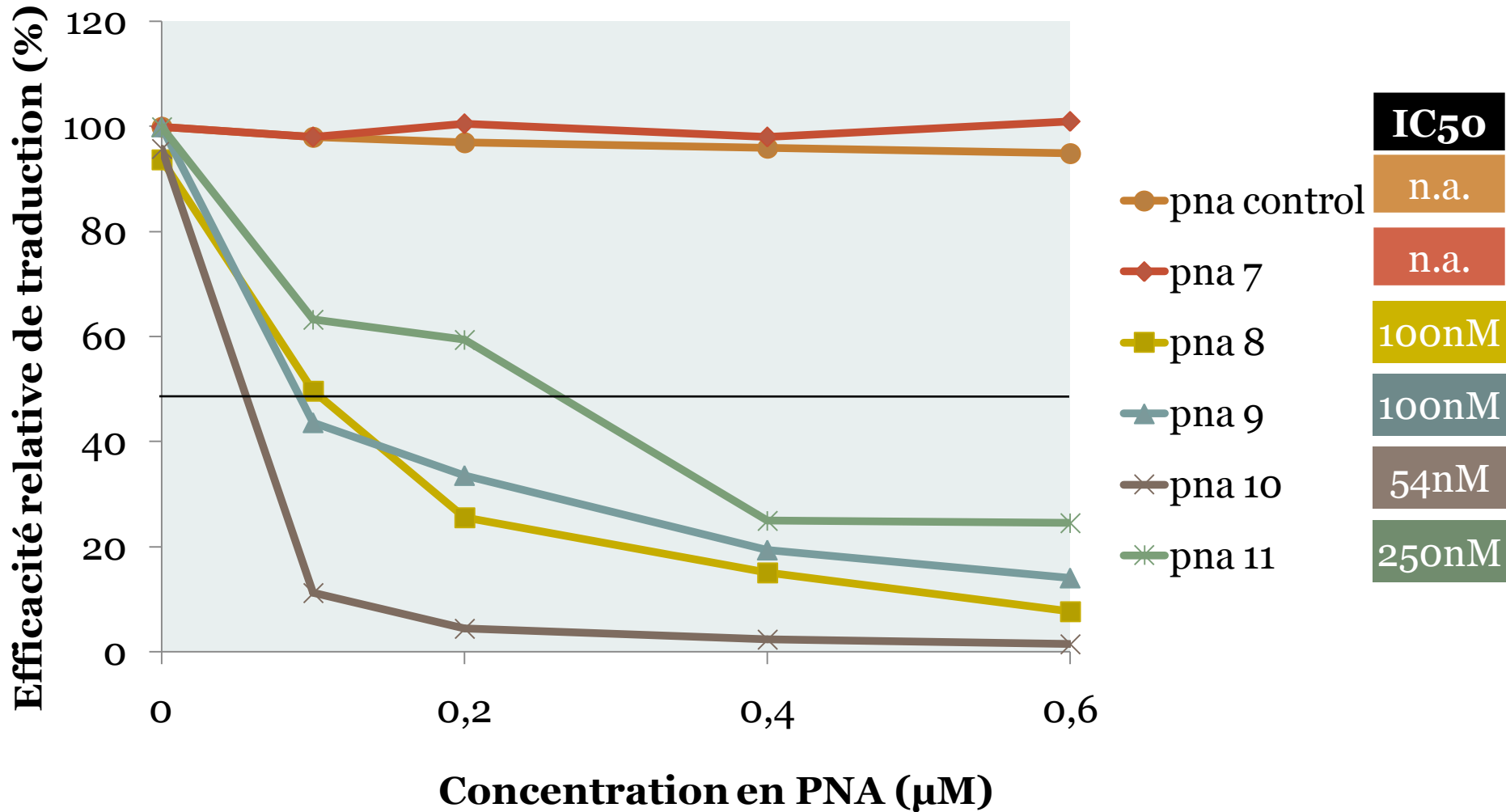
# Composés et cibles

Nom	Cible	Size	Sequence
LCBO 7	IIIId	7 mer	ACCCAA-K
LCBO 8		10mer	CGACCCAACG
LCBO 8 mm		10 mer	CGACACAACG
LCBO 9		10mer-K	CGACCCAACG-K
LCBO 10	IV	10mer-K	GTGCTCATGG-K
LCBO 10 mm		10 mer-K	GTGCTCTTGG-K
LCBO 11		7mer-K	TCATGGT-K

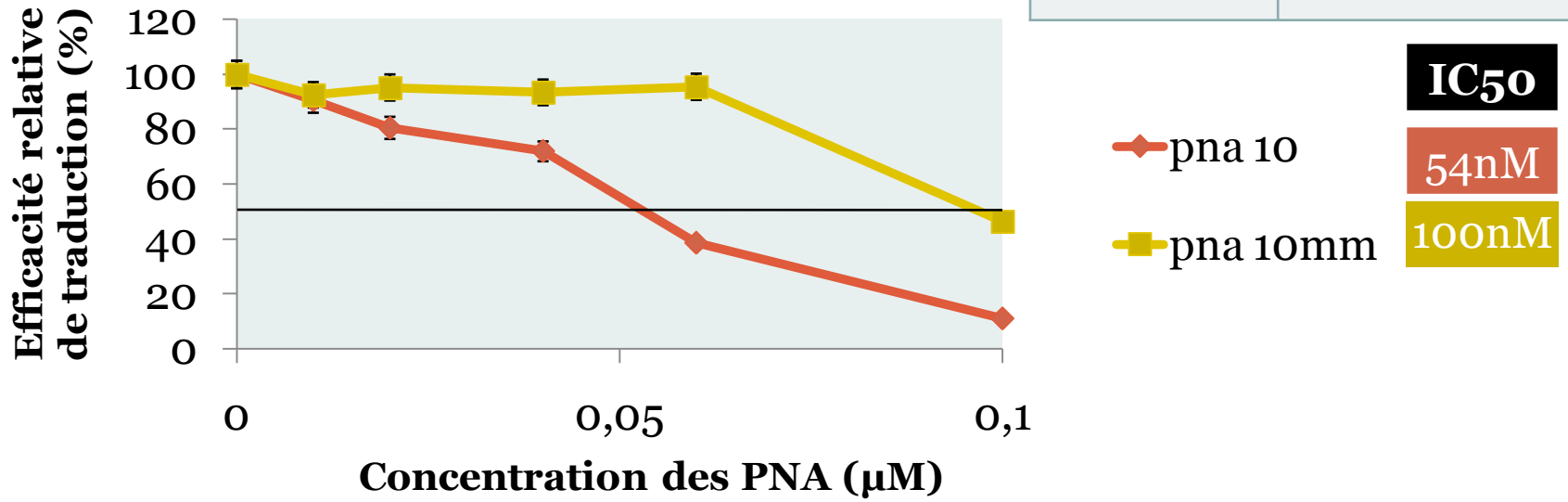
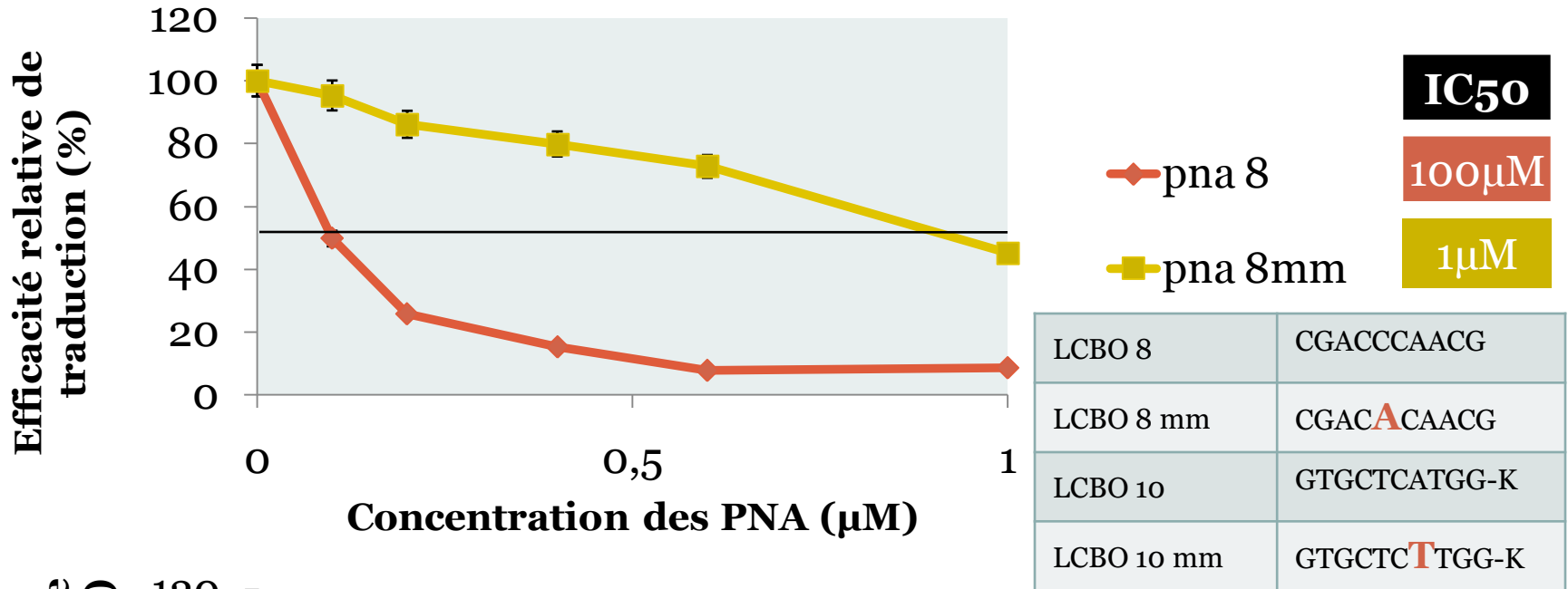


**Originalité:**  
 -1<sup>ère</sup> étude contre le VHC\*  
 -Composés courts

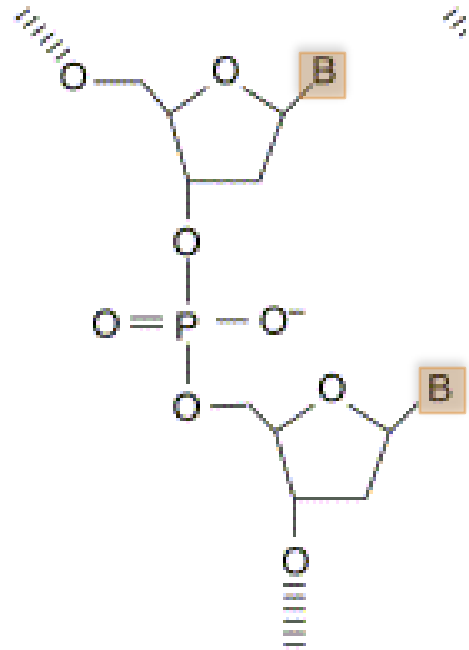
# Activité des PNA sur la traduction dépendante de l'IRES du VHC



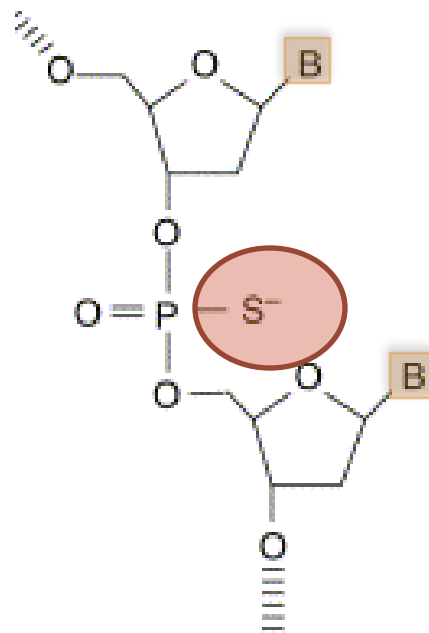
# Effets des mésappariements



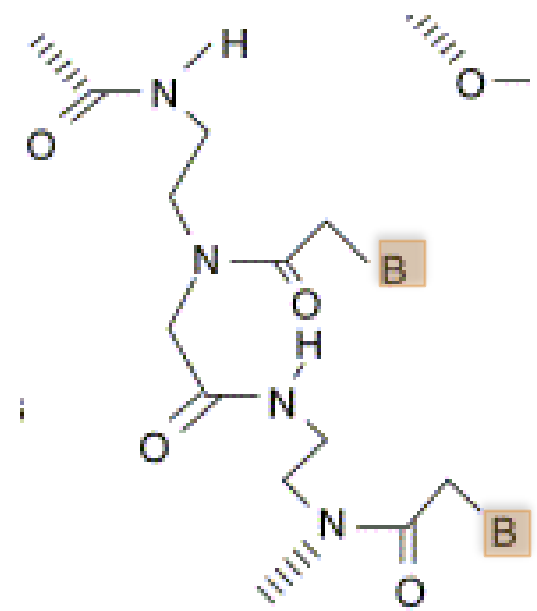
# PNA vs Phosphorotioates



ADN



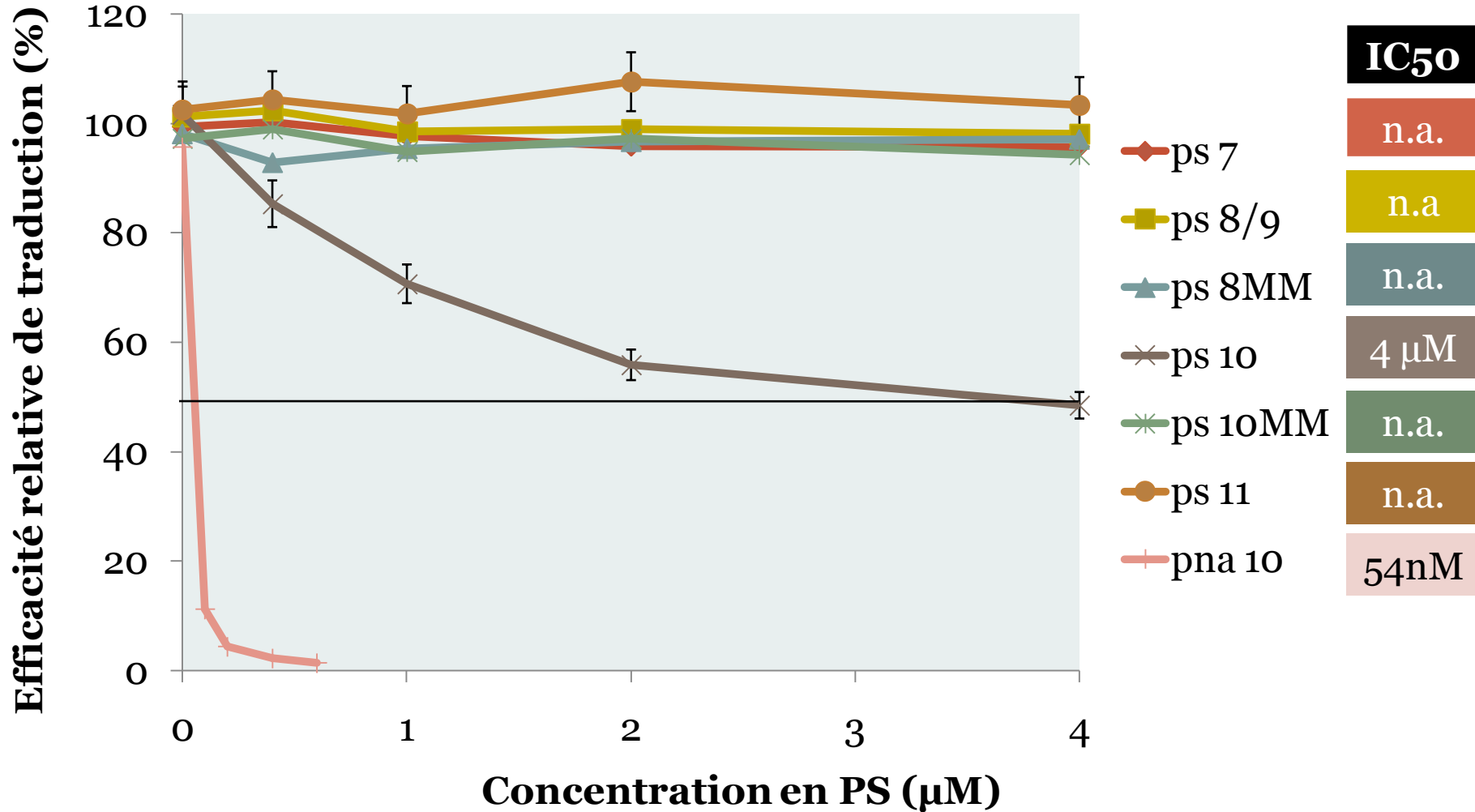
Phosphorothioates (PS)  
1<sup>ère</sup> génération d'antisens



PNA  
3<sup>ème</sup> génération



# PNA vs Phosphorothioates

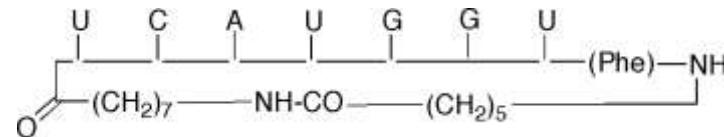
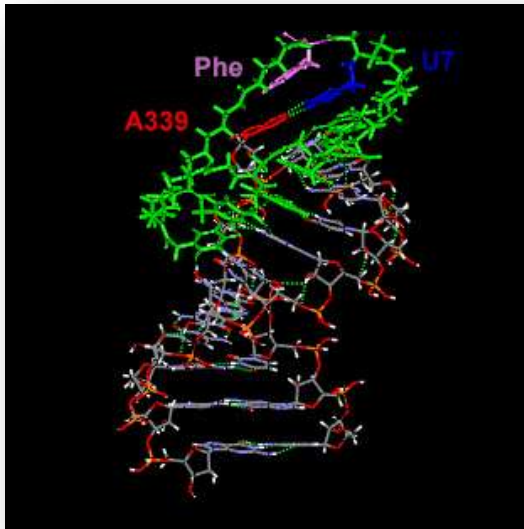


## PNA cyclique : rationnel

- Inhibition de la région IV de l'IRES en **mimant les interactions boucle-boucle**

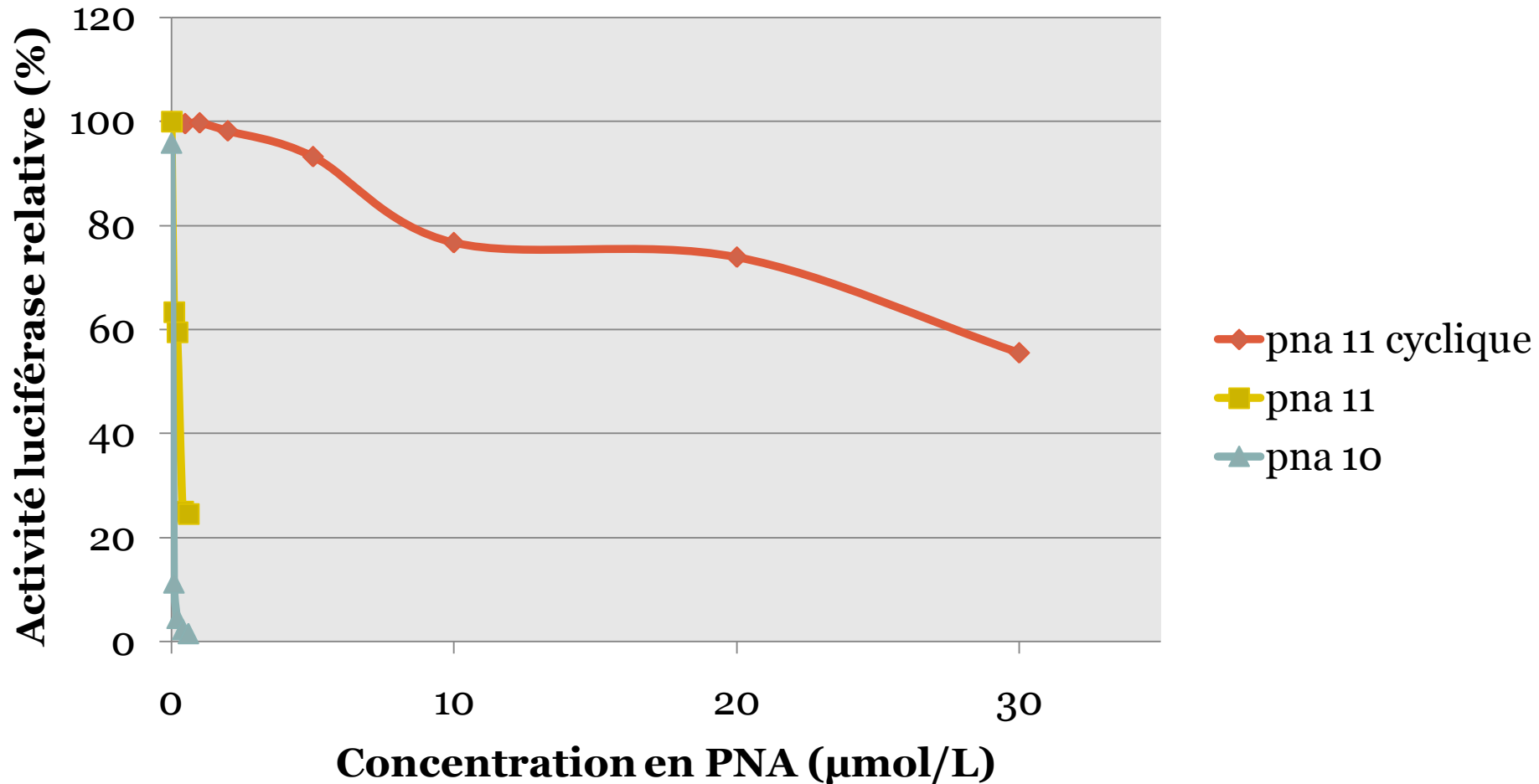


Toulme *et al*, 2003

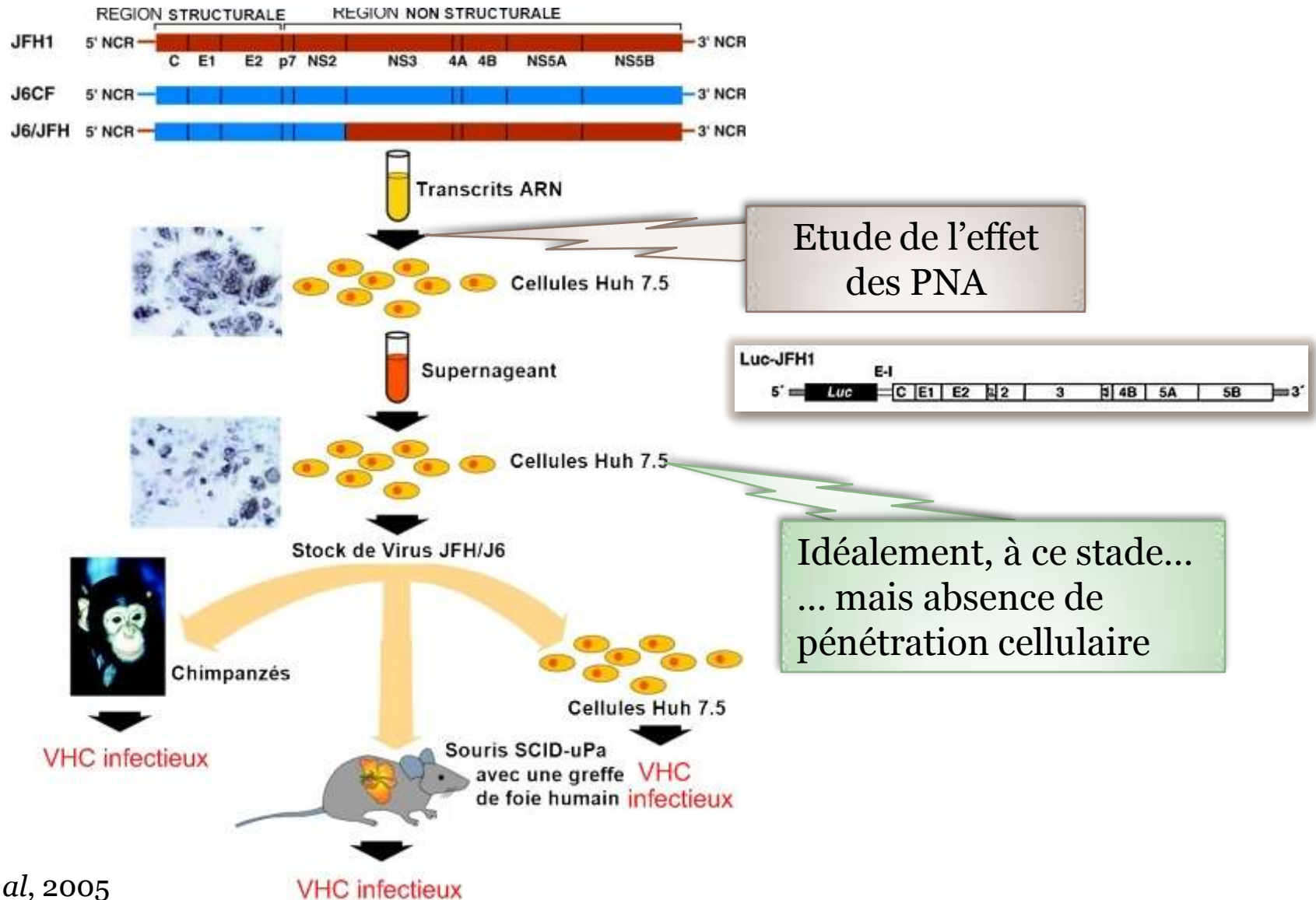


- Objectifs:
  - Meilleure sélectivité
  - Conserver un faible poids moléculaire

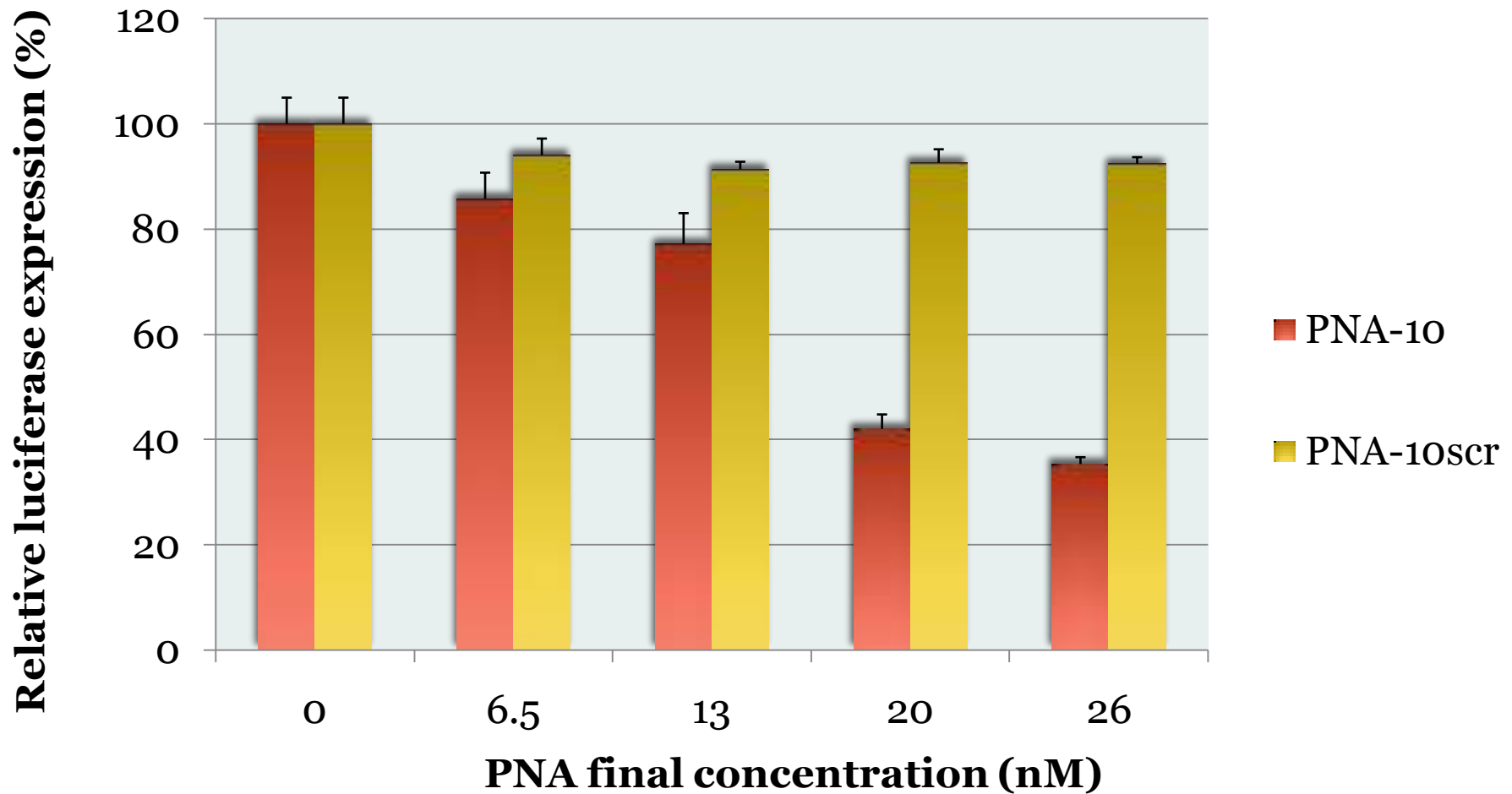
## Inhibition *in vitro* de la traduction IRES dépendante



# Systeme de répliation complet



# Inhibition en système JFH1

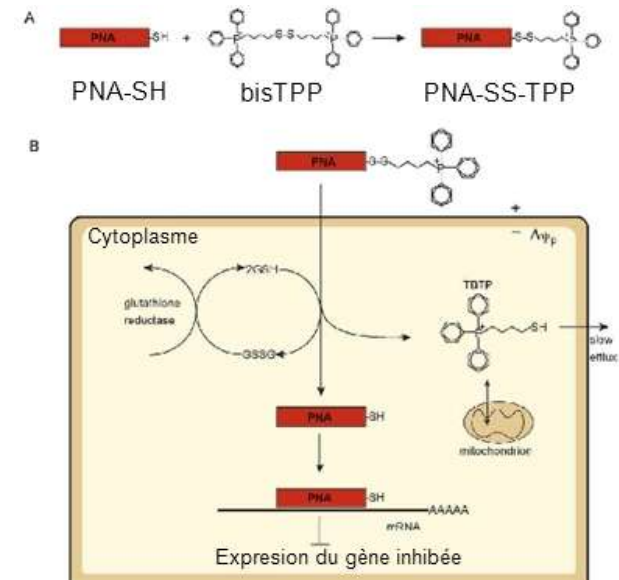
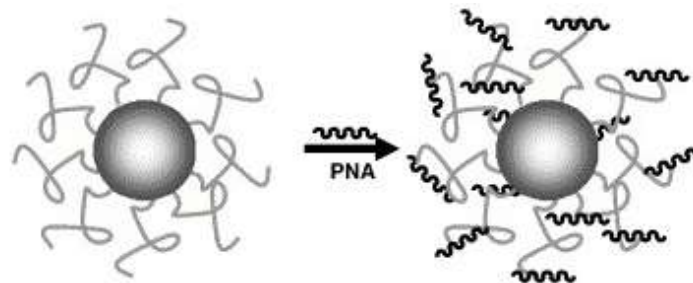


# Conclusions

- PNA testés actifs *in vitro*
  - IC<sub>50</sub> 54nM - 260nM
  - Region IV est la plus sensible
  - Avantage PNA *vs* antisens 1ère génération
- Inhibition spécifique
  - 1 mésappariement = baisse de l'IC<sub>50</sub>
- 1<sup>ère</sup> démonstration de l'activité inhibitrice d'un PNA cyclique
  - Rationnel de l'étude confirmé
  - Activité faible comparé aux linéaires
- Résultats prometteurs en système de réplication complet
  - Pénétration cellulaire : problème persistant

## Perspectives

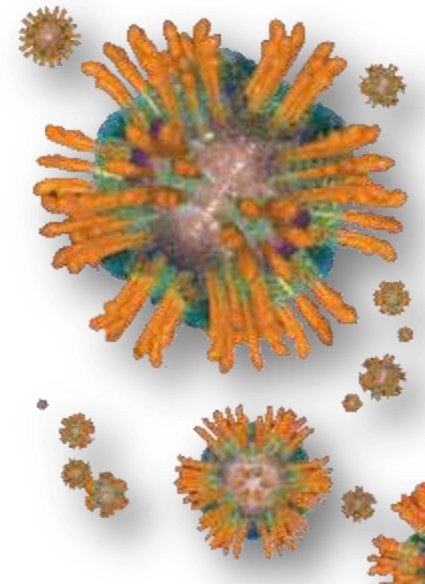
- Amélioration de la pénétration cellulaire
  - Conjugués lipophiles
  - Opsonisation sur des microsphères
  - Co-transfection ADN
  - Peptides de pénétration
  - ...



- Etudes sur système de réplication complet JFH1

# Conclusions & Perspectives

Quels traitements de l'hépatite C dans le futur ?





# Perspectives thérapeutiques

- Forte dépendance aux modèles d'études
- Pistes d'améliorations possibles de la thérapie:
  - Amélioration de la bithérapie actuelle
  - Développement de nouvelles approches antivirales
  - Mise au point d'un vaccin thérapeutique ?

# Amélioration de la bithérapie actuelle

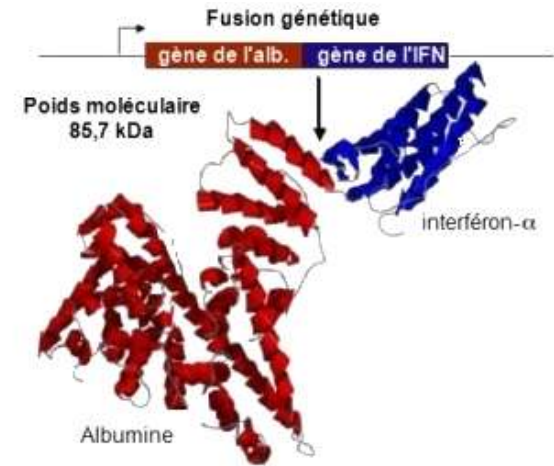
- Nouveaux interférons

- Interféron Consensus
- Interféron Albumine
- Interférons « Variants »

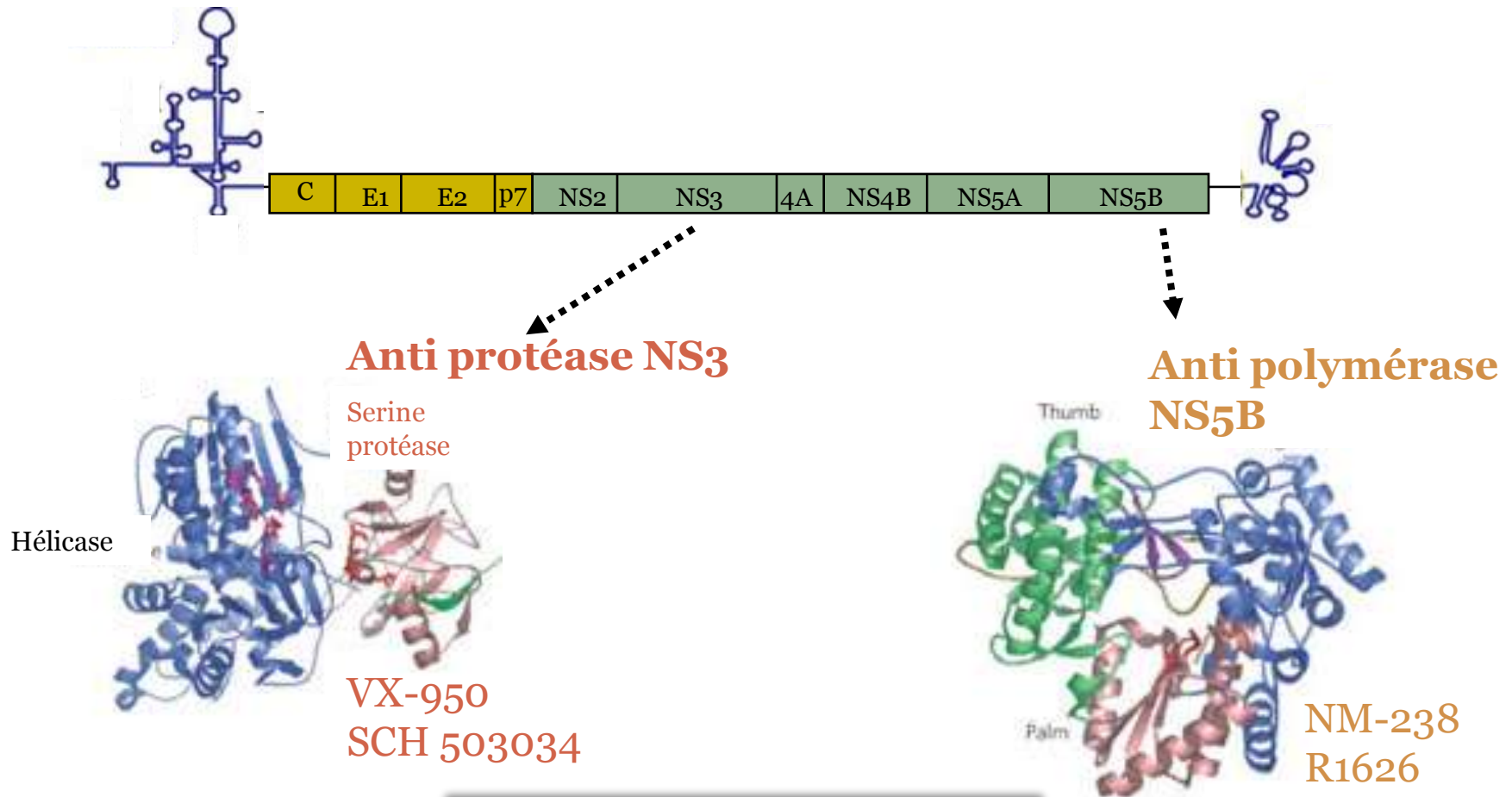
- Par brassage d'ADN (technologie Maxygen)
- **Recherche de « variants » naturels**

- Dérivés de la ribavirine

- Viramidine



# Nouvelles approches : en essais cliniques



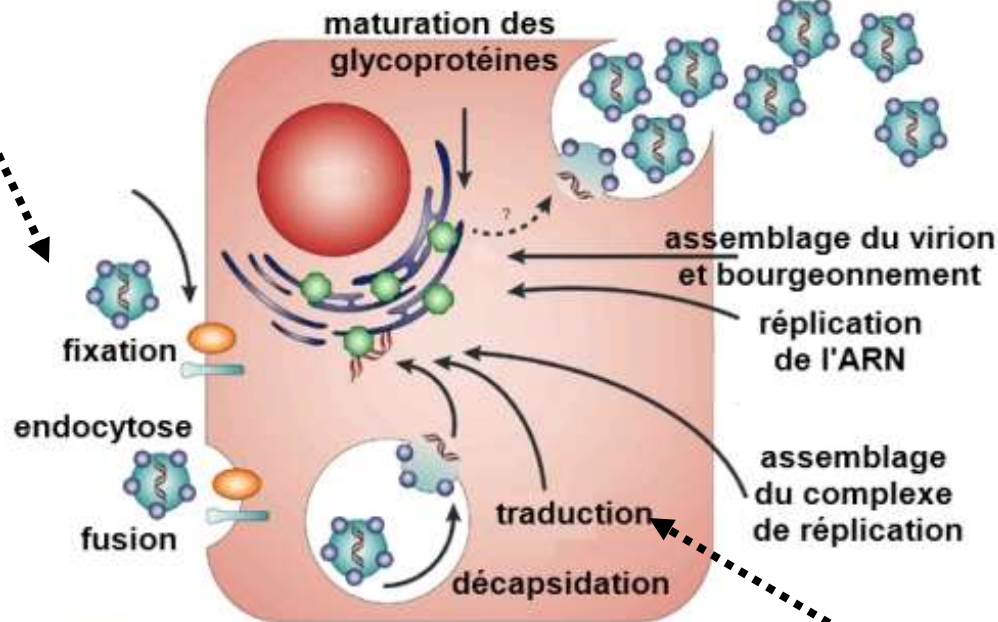
- En essais cliniques
- Problèmes de résistances

# Nouvelles approches : en développement

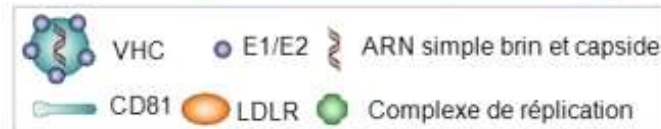
Inhibiteurs d'entrée

Inhibiteurs de glycosylation

Inhibiteurs d'encapsidation



- Actifs *in vitro*,
- Utilisation clinique non assurée



Antisens (**PNA**),  
Ribozymes,  
Aptamères,  
siRNAs

# Un énorme merci !

**Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (Nice)**

Audrey Di Giorgio, Mohamed Mehiri, Sergio Caldarelli & Roger Condom

**ANRS**  
anRS

**GenOdyssee SA**  
Jean Louis Escary

**Ministère de**  
**la recherche**

**INSERM U271 (U871)**

Olivier Hantz, Fabien Zoulim, Christian Trepo...

...Vanessa Escuret, David Durantel ...

... et à tous les membres du laboratoire

