



**HAL**  
open science

# Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr : étude in vitro de l'inhibition du cycle lytique du virus par ARN interférence

Ariane Bas

► **To cite this version:**

Ariane Bas. Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr : étude in vitro de l'inhibition du cycle lytique du virus par ARN interférence. Sciences pharmaceutiques. 2007. dumas-01320355

**HAL Id: dumas-01320355**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01320355v1>

Submitted on 23 May 2016

**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.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

B.U.M. GRENOBLE



2<sup>e</sup> Ex.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2007

N° 7041

**Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus  
d'Epstein-Barr : étude *in vitro* de l'inhibition du cycle lytique du virus par  
ARN interférence**

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 23 novembre 2007

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Ariane BAS

*[Données à caractère personnel]*

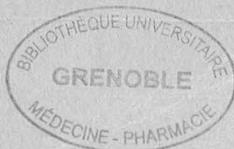
DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président : Madame le Professeur R. Grillot

Membres : Monsieur le Professeur P. Morand

Madame le Docteur R. Germi

Monsieur le Docteur J.M. Crance



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2007

**Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus  
d'Epstein-Barr : étude *in vitro* de l'inhibition du cycle lytique du virus par  
ARN interférence**

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Conformément aux dispositions du décret n° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

**THESE**

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Grenoble

Et soutenue publiquement le 23 novembre 2007

Pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Ariane BAS

*[Données à caractère personnel]*

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président : Madame le Professeur R. Grillot  
Membres : Monsieur le Professeur P. Morand  
Madame le Docteur R. Germi  
Monsieur le Docteur J.M. Crance



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT  
Vice -Doyenne : Mme Edwige NICOLLE

**PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE**

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (GRNR, INSERM E03 40)
<b>BURMEISTER</b>	Wilhelm	Physique (I.V.M.S)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
<b>DANEL</b>	Vincent	SAMU-SMUR et Toxicologie (CHU)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Bio Inorganique (D.P.M.)
<b>DEMENGE</b>	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie (I.V.M.S)
<b>FAVIER</b>	Alain	Biochimie (L.A.N)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
<b>GOULON</b>	Chantal	Physique (E.S.R.F)
<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (CHU)
<b>LECLERC</b>	Gérard	Chimie organique
<b>MARIOTTE</b>	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie / Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie (N.V.M.C.)
<b>SEIGLE MURANDI</b>	Françoise	Emérite
<b>STEIMAN</b>	Régine	Biologie Cellulaire (T.I.M.C.)
<b>WOUESSIDJEWE</b>	Denis	Pharmacotechnie et Vectorisation (D.P.M.)

**PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)**

<b>CHAMPON</b>	Bernard	Pharmacie Clinique
<b>RIEU</b>	Isabelle	Qualitologie

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice -Doyenne : Mme **Edwige NICOLLE**

**MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE**

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M./UMR CNRS 5163)
<b>ALLENET</b>	Benoît	Pharmacie Clinique (CHU/ ThEMAS TIMC-IMAG)
<b>BARTOLI</b>	Marie-Hélène	Pharmacologie et Physiologie
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (INSERM E-0221 Bioénergétique Fondamentale et Appliquée)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Pharmacognosie (D.P.M.)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.A.N.)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique Structurale (I.V.M.S.)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie et Vectorisation (D.P.M.)
<b>COLLE</b>	Pierre Emmanuel	Anglais
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé (Lyon)
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
<b>DESIRE</b>	Jérôme	Chimie Bio- organique (D.P.M.)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Virologie (I.B.S.)
<b>ESNAULT</b>	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie et Vectorisation (D.P.M.)
<b>GERMI</b>	Raphaële	Microbiologie (I.V.M.S. / CHU)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>GUIRAUD</b>	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique (T.I.M.C)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (N.V.M.C)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie -Pharmacologie (HP2)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Botanique - Cryptogamie (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CHU/CIB)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.A.N.)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>SEVE</b>	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (I.V.M.S.)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie Bio organique (D.P.M.)
<b>VILLEMAIN</b>	Danielle	Biostatistiques (Radio pharmaceutiques Bio cliniques, INSERM E03 40)
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)

## ENSEIGNANTS ANGLAIS

FITE Andrée  
GOUBIER Laurence

## POSTES D'ATER

½ ATER	TRAVIER Laetitia	Immunologie
½ ATER	SACCONI Patrick	Mycologie
1 ATER	MICHALET Serge	Pharmacognosie
1 ATER	KHALEF Nawel	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Précédés Pharmaceutiques (GRNR, INSERM, E03 40)
1 ATER	BEGUIN Pauline	Physiologie

## PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

**ROUTABOUL**

Christel

Chimie Générale (D.P.M.)

**Madame le Doyen de Pharmacie et Professeur R. Grillot,**

*c'est un honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect.*

**Madame le Docteur R. Germi,**

*je vous suis reconnaissante d'avoir encadré mon travail et vous remercie pour la grande disponibilité dont vous avait fait part à mon égard ainsi que pour vos nombreux conseils.*

**Monsieur le Professeur P. Morand,**

*je vous remercie pour votre accueil au sein du laboratoire de virologie où j'ai pu participer à l'activité des différents secteurs du laboratoire. J'ai apprécié votre bonne humeur pendant toute la période où j'ai travaillé au laboratoire de virologie.*

**Monsieur le Professeur J.M. Crance,**

*je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce Jury et de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Je vous remercie également de m'avoir accueillie dans les locaux du CRSSA, où j'ai pu utiliser un matériel de qualité afin de compléter mes expériences.*

**Monsieur le Professeur J.M. Seigneurin,**

*je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions pour ma thèse.*

**Madame le Docteur S. Larrat,**

*je te remercie pour tes conseils et ton écoute. Je te remercie également de m'avoir fait profiter de tes nombreux acquis dans le domaine de la biologie.*

**Mesdames les Docteurs M. Baccard et C. Morel-Baccard,**

*je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein du laboratoire et pour votre disponibilité. Merci de m'avoir fait partager votre expérience dans le domaine de la sérologie virale.*

**A toute l'équipe du laboratoire de virologie,**

*merci pour votre bonne humeur et votre compagnie.*

*Je remercie également Solenne, de m'avoir fait part de son expérience dans le domaine de l'ARN interférence, Julien et Véronique Boyer pour leur aide concernant les techniques d'immunofluorescence et Anne Signori-Schmück pour sa gentillesse.*

*Je remercie mes co-internes Nadia, Nicolas, Céline, Raphael, Catherine et Julien et tous mes amis pour leur soutien et leur amitié.*

*Enfin, je remercie ma famille, pour son soutien et sa disponibilité depuis de nombreuses années.*

# SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>11</b>
<b>I Le virus d'Epstein Barr .....</b>	<b>12</b>
<b>1 Structure et génome du virus .....</b>	<b>12</b>
<b>2 Cycle viral.....</b>	<b>14</b>
2.1 Cycle de latence .....	14
2.2 Cycle lytique (réplication productive) .....	15
<b>3 Physiopathologie .....</b>	<b>17</b>
3.1 Transmission .....	17
3.2 Cellules cibles .....	18
3.3 Réponse immunitaire .....	18
3.4 Transformation cellulaire.....	19
<b>4 Pathologies associées au virus d'Epstein Barr .....</b>	<b>20</b>
4.1 Primo infection EBV et mononucléose infectieuse.....	20
<i>a Historique de la mononucléose infectieuse.....</i>	<i>20</i>
<i>b Epidémiologie.....</i>	<i>20</i>
<i>c Clinique.....</i>	<i>21</i>
4.2 Persistance de l'EBV et maladies associées.....	22
<i>a Chez l'immunocompétent.....</i>	<i>23</i>
<i>b Chez l'immunodéprimé.....</i>	<i>24</i>
<b>5 Traitements antiviraux disponibles .....</b>	<b>26</b>
<b>II L'ARN interférence.....</b>	<b>29</b>
<b>1 Historique de l'ARN interférence .....</b>	<b>29</b>
<b>2 Mécanisme de l'ARN interférence (figure 7) .....</b>	<b>30</b>
<b>3 Rôles de l'ARN interférence .....</b>	<b>34</b>
3.1 Outil expérimental .....	34
3.2 Activité antivirale .....	34
3.3 Régulation de l'expression du génome .....	36
<b>4 ARN interférence et virus .....</b>	<b>38</b>
4.1 siRNA et virus à ARN .....	38
4.2 siRNA et virus à ADN .....	40
<i>a Virus de l'hépatite B .....</i>	<i>40</i>
<i>b Papillomavirus.....</i>	<i>42</i>
<i>c Virus d'Epstein Barr.....</i>	<i>44</i>
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL.....</b>	<b>48</b>
<b>I Objectifs du travail.....</b>	<b>49</b>
<b>II Matériel et méthodes .....</b>	<b>50</b>
<b>1 lignées cellulaires et virus .....</b>	<b>50</b>

1.1	Les cellules 293 EBV-GFP .....	50
1.2	Les cellules Raji.....	52
1.3	Culture cellulaire.....	52
<b>2</b>	<b>Synthèse des siRNA .....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Transfection .....</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Immunofluorescence indirecte sur les cellules 293 EBV-GFP .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Quantification des ARNmessagers par RT-PCR en temps réel.....</b>	<b>58</b>
5.1	Extraction des ARN messagers.....	58
5.2	RT-PCR de l'ARNm de la protéase.....	58
5.3	Quantification de l'ARNm de la protéase.....	59
5.4	RT-PCR de l'ARNm de MAPK1 .....	61
5.5	RT-PCR de l'ARNm de la GAPDH .....	61
<b>6</b>	<b>Western Blot.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Test d'infectiosité des surnageants de culture .....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Evaluation de la production d'interféron.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Test statistiques utilisés .....</b>	<b>66</b>
<b>III</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>67</b>
<b>1</b>	<b>Optimisation des conditions expérimentales.....</b>	<b>67</b>
1.1	Quantification des ARNm de la protéase.....	67
1.2	Transfection .....	67
1.3	Extinction d'un gène et cotransfection siRNA/plamides inducteurs.....	69
1.4	Induction de la production de virions EBV dans les cellules 293 EBV-GFP .....	70
<b>2</b>	<b>Inhibition de la réplication de l'EBV par les siRNA .....</b>	<b>72</b>
2.1	Inhibition par un pool de 4 siRNA dirigés contre la protéase .....	72
<i>a</i>	<i>Protocole de transfection en une étape.....</i>	<i>72</i>
<i>b</i>	<i>Protocoles de transfection en deux étapes.....</i>	<i>74</i>
2.2	Inhibition par chaque siRNA pris séparément .....	75
2.3	Effet de la concentration sur l'activité inhibitrice des siRNA.....	75
<i>a</i>	<i>Effet de fortes concentrations .....</i>	<i>75</i>
<i>b</i>	<i>Effet de faibles concentrations.....</i>	<i>76</i>
<b>3</b>	<b>Evaluation de la production d'interféron.....</b>	<b>80</b>
<b>IV</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>82</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>87</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>90</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : structure du virus d'Epstein-Barr, microscopie électronique	12
<b>Figure 2</b> : représentation schématique de l'EBV	13
<b>Figure 3</b> : cycle de latence et cycle lytique du virus	16
<b>Figure 4</b> : structure de la protéase	17
<b>Figure 5</b> : phénotypes de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenus après introduction du gène de la chalcone synthase	29
<b>Figure 6</b> : structure de l'enzyme Dicer	31
<b>Figure 7</b> : mécanisme de l'ARN interférence, schéma simplifié	32
<b>Figure 8</b> : boucle d'amplification chez le nématode	33
<b>Figure 9</b> : comparaison des mécanismes d'action des siRNAs et miRNAs	37
<b>Figure 10</b> : conception des cellules 293 EBV-GFP	51
<b>Figure 11</b> : fluorescence des cellules 293 EBV-GFP	51
<b>Figure 12</b> : représentation schématique des siRNA utilisés et leur position au sein du génome de l'EBV	54
<b>Figure 13</b> : position du siRNA MAPK1 utilisé au sein du gène MAPK1	55
<b>Figure 14</b> : représentation schématique du protocole expérimental de transfection	56
<b>Figure 15</b> : obtention d'un transcrit d'ARN à partir d'un produit de PCR	60
<b>Figure 16</b> : observation microscopique des cellules Raji surinfectées par les surnageants de culture	64
<b>Figure 17</b> : immunofluorescence indirecte sur les cellules 293 EBV-GFP	68
<b>Figure 18</b> : extinction de l'expression du gène MAPK1 par les siRNA anti MAPK1	69
<b>Figure 19</b> : induction du cycle lytique par différentes concentrations de plasmides (0 ; 0,5 ; 1 et 1,5 µg par puits)	71
<b>Figure 20</b> : cinétique des ARNm de la protéase après induction	71
<b>Figure 21</b> : inhibition de la réplication de l'EBV par un pool de 4 siRNA anti protéase	73
<b>Figure 22</b> : résultats des différents protocoles en deux étapes	74
<b>Figure 23</b> : activité de chacun des siRNA constituant le pool	75
<b>Figure 24</b> : microscopie de fluorescence, surinfection des cellules Raji : effet de la concentration	77
<b>Figure 25</b> : corrélation entre le logarithme de la concentration de siPR1 et le pourcentage d'expression de l'ARNm de la protéase ou le pourcentage de virions infectieux dans le surnageant	78

<b>Figure 26</b> : western blot de la protéase	79
<b>Figure 27</b> : expression de l'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP traitées par siPR1	80
<b>Figure 28</b> : expression de l'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP non induites	81

## TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : protéines de latence du virus d'Epstein-Barr	15
<b>Tableau II</b> : complications aiguës potentiellement graves des MNI	22
<b>Tableau III</b> : supresseurs du RNA « silencing »	35
<b>Tableau IV</b> : ARN interférence et virus à ARN	39
<b>Tableau V</b> : études d'ARN interférence <i>in vivo</i> contre le virus de l'hépatite B	42
<b>Tableau VI</b> : ARN interférence et virus d'Epstein-Barr	47
<b>Tableau VII</b> : séquence des amorces et sondes utilisées, RT-PCR protéase	59
<b>Tableau VIII</b> : composition du mélange réactionnel, RT-PCR protéase	59
<b>Tableau IX</b> : caractéristiques de la RT-PCR protéase	59
<b>Tableau X</b> : composition du mélange réactionnel de la PCR produisant un ADN comportant le promoteur T7	60
<b>Tableau XI</b> : caractéristiques de la PCR produisant un ADN comportant le promoteur T7	60
<b>Tableau XII</b> : caractéristiques de la réaction de transcription	61
<b>Tableau XIII</b> : séquence des amorces et sondes utilisées, RT-PCR GAPDH	62
<b>Tableau XIV</b> : composition du mélange réactionnel, RT-PCR OAS1 et OAS2	65
<b>Tableau XV</b> : caractéristiques de la RT-PCR OAS1 et OAS2	65
<b>Tableau XVI</b> : reproductibilité de la gamme de transcrits de la protéase	67
<b>Tableau XVII</b> : activité inhibitrice de différentes concentrations de PR1 : fortes concentrations	75
<b>Tableau XVIII</b> : activité inhibitrice de différentes concentrations de PR1 : faibles concentrations	78

## TABLES DES ABREVIATIONS

ADN : acide desoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNdb : ARN double brin  
ARNm : ARN messenger  
CHS : chalcone synthase  
CoV-SARS : coronavirus associé au syndrome aigu respiratoire sévère  
EA : early antigen  
EBER : epstein-barr encoded RNA  
EBV: epstein-barr virus  
EBNA : epstein-barr nuclear antigen  
ECL : enhanced chemiluminescence  
GAPDH : glycéridehyde phosphate déshydrogénase  
GFP : green fluorescent protein  
HPV : human papilloma virus  
IR : internal repeat  
LB : lymphocytes B  
LMP : latent membrane protein  
MAPK1: mitogen-activated protein kinase 1  
miRNA : microRNA  
MNI : mononucléose infectieuse  
NK : natural killer  
NPC : carcinome du nasopharynx  
OAS : oligoadénylate synthase  
PCR : polymérase chain reaction  
PK : protein kinase  
PTGS : post-transcriptional gene silencing  
RISC : RNA-induced silencing complex  
RdRP : RNA-directed RNA polymerase  
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
shRNA : short hairpin RNA  
siRNA : small interfering RNA  
SLPT : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

UL: unit long

US: unit short

UTR: untranslated region

VHB: virus de l'hépatite B

VHC: virus de l'hépatite C

VIIH: virus de l'immunodéficience humaine

# **INTRODUCTION**

---

Découvert en 1964 dans une lignée cellulaire issue de biopsie de lymphome de Burkitt africain, le virus d'Epstein-Barr (EBV) appartient à la famille des *herpesviridae*, famille dont les membres ont la particularité de persister à l'état latent dans l'organisme après la primo-infection.

L'EBV est présent dans plus de 90% de la population adulte. Généralement asymptomatique chez l'enfant, la primo-infection peut être responsable de la mononucléose infectieuse, infection qui est généralement contrôlée de manière efficace par le système immunitaire. Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie chez l'individu infecté. Cette persistance est le résultat d'une infection latente et d'une infection lytique qui se déroulent dans les lymphocytes B et dans les cellules épithéliales de l'oropharynx. L'infection à EBV a également été associée à certains cancers parmi lesquels le lymphome de Burkitt, le carcinome du nasopharynx et certains syndromes lymphoprolifératifs chez l'immunodéprimé. Le cycle lytique pourrait être impliqué dans la pathogénèse de certains de ces cancers.

Les antiviraux actuellement disponibles contre les *Herpesviridae*, inhibiteurs de l'ADN polymérase virale, se sont révélés inconstamment efficaces contre l'EBV et les maladies qui lui sont associées. Il est donc intéressant de rechercher d'autres stratégies pour lutter contre les manifestations cliniques liées à ce virus. Une stratégie potentielle est d'inhiber la protéase virale, comme cela a été décrit pour d'autres virus. Cette protéine, exprimée pendant le cycle lytique du virus, est essentielle à la production de nouveaux virions puisqu'elle permet la formation d'une capsid virale mature et l'incorporation de l'ADN dans cette capsid.

L'ARN interférence, a été découvert dans les années 1990. Ce mécanisme d'inhibition de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel est de plus en plus étudié à l'heure actuelle comme potentielle stratégie thérapeutique.

Dans cette étude, des siRNA dirigés contre la protéase ont été testés pour leur capacité à inhiber de manière spécifique l'expression de la protéase et la réplication virale.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

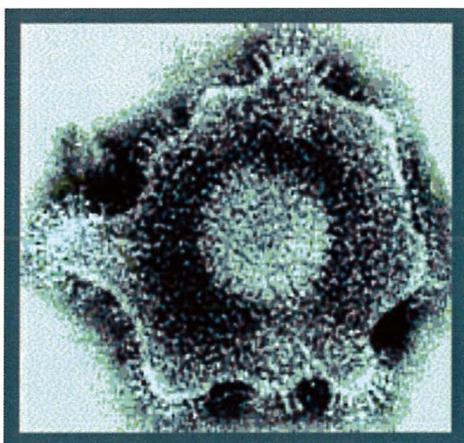
# I Le virus d'Epstein Barr

---

Le virus d'Epstein Barr est un *herpesvirus* de la famille des *herpesviridae* (*herpesvirus* humain de type 4), de la sous-famille des *herpesvirinae* et du genre lymphocryptovirus. Ce virus a été mis en évidence par microscopie électronique en 1964 par Epstein, Achong et Barr dans une lignée cellulaire obtenue à partir d'un lymphome de Burkitt (32).

## 1 Structure et génome du virus

Les particules virales dont la taille est d'environ 150 nm ont une structure similaire à celle des autres *Herpesviridae* (figure 1). De l'intérieur vers l'extérieur, il comprend un nucléoïde (ADN bicaténaire linéaire entouré autour d'une structure protéique), une capsidie icosaédrique, un tégument et une enveloppe. L'enveloppe, dérivée des membranes cellulaires, porte en surface des glycoprotéines virales sous forme de spicules. La structure externe du virus le rend fragile dans le milieu extérieur.

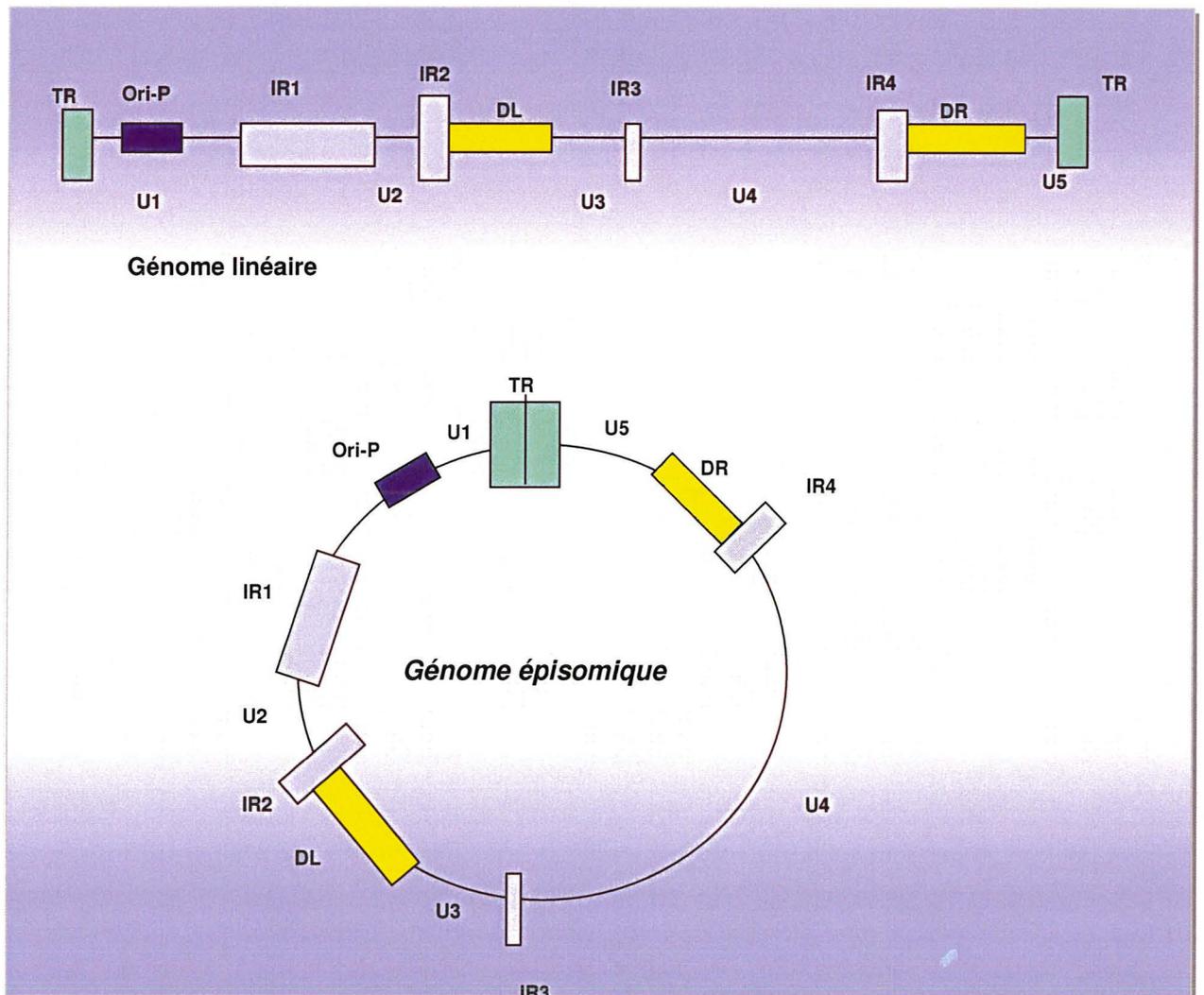


**Figure 1 : structure du virus en microscopie électronique**

Le génome de l'EBV (figure 2) est une molécule d'ADN double brin de 184000 paires de bases qui code pour une centaine de protéines. Il comprend deux domaines uniques : un domaine court US (short unique region, U1) et un domaine long (UL, long unique region). Une répétition interne en tandem, « internal repeat (IR1) » s'intercale entre ces deux domaines. Dans le domaine UL, il existe trois autres séquences répétées internes (IR2, IR3

et IR4) qui divisent UL en 4 domaines (U2, U3, U4 et U5). Chaque extrémité comporte des répétitions terminales TR (terminal repeat) qui permettent la circularisation du génome dans certaines circonstances lors de la réplication de l'ADN.

Le génome viral est sous forme linéaire dans la particule virale. La circularisation du génome en épisode dans le noyau cellulaire se fait par fusion des deux TR, c'est sous cette forme épisomale que le virus persiste à l'état latent dans la cellule. Pendant la phase de latence, l'EBV se réplique de façon synchrone avec la cellule infectée lors de la phase S du cycle cellulaire, en utilisant l'origine de réplication latente, Ori-P. A proximité des régions IR2 et IR4, existent deux régions homologues nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences sont les deux origines de réplication lytique (OriLyt) de l'EBV, qui permettent la réplication du génome sous forme linéaire par l'ADN polymérase virale.



**Figure 2 : représentation schématique du génome de l'EBV (113)**

## 2 Cycle viral

Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B. L'EBV possède des gènes codant pour des protéines virales associées à la latence et des gènes codant pour des protéines responsables de l'entrée dans le cycle lytique et de la production de nouveaux virions.

### 2.1 Cycle de latence

Après la primo-infection, certaines cellules infectées échappent au système immunitaire, établissant une latence dans les lymphocytes B mémoires. Les gènes viraux exprimés sont alors restreints. Il existe 9 protéines associées à la latence : 6 protéines nucléaires (Epstein-Barr nuclear antigen, EBNA) et 3 protéines membranaires (latent membran protein, LMP), ainsi que 2 ARN non traduits, les EBER (Epstein-Barr Encoded small RNA). Le polymorphisme des gènes EBNA2, EBNA3 et des EBER permet de classer les isolats en deux types viraux : EBV-1 et EBV-2. Certaines des protéines de latence sont indispensables à la transformation cellulaire, en particulier EBNA-2, -3A, -3C et LMP1 (tableau I). L'EBV possède en effet la propriété d'induire l'immortalisation des lymphocytes B qu'il infecte, c'est à dire que les lymphocytes infectés prolifèrent indéfiniment et donnent naissance à une population de cellules que l'on appelle lignée lymphoblastoïde. Ces cellules expriment alors une latence de type III, qui correspond à l'expression de toutes les protéines de latence. La latence de type III est décrite dans les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation et dans certains lymphomes des sujets VIH-positif. D'autres programmes de latence existent en fonction des protéines exprimées par les cellules infectées. La latence de type I correspond à l'expression d'EBNA1 et des EBER, et est décrite principalement dans le cas du lymphome de Burkitt. La latence de type II correspond à l'expression d'EBNA1, des protéines LMP1 et LMP2 et des EBER et est décrite dans les carcinomes du nasopharynx, les carcinomes gastriques ou encore la maladie de Hodgkin. Les programmes de latence ne sont pas figés. Ainsi, dans le cas des carcinomes du nasopharynx, la latence peut être de type I ou II. L'expression peut également être hétérogène au sein d'une même tumeur.

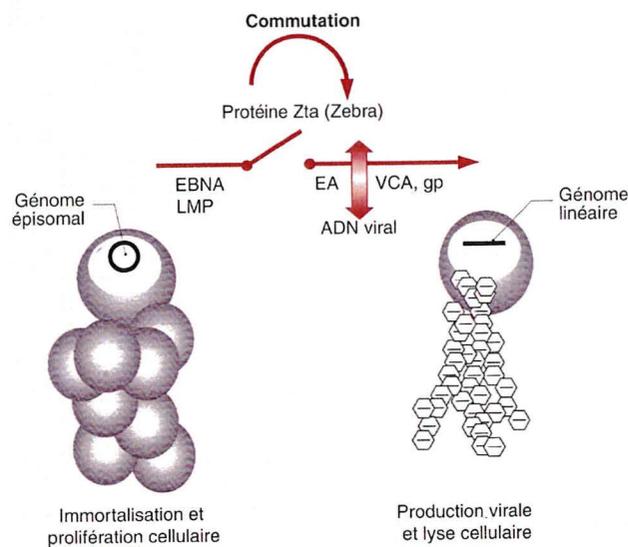
**Tableau I : protéines de latence du virus d'Epstein-Barr**

Protéine virale	Latence	Localisation	Fonctions principales
<b>EBNA1</b>	I, II, III	Nucléaire	Maintien du génome viral sous forme épisomale
<b>EBNA2</b>	III	Nucléaire	Immortalisation des lymphocytes B, activateur de transcription cellulaire et virale
<b>EBNA3A (ou EBNA3)</b>	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation des LB
<b>EBNA3B (ou EBNA4)</b>	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBP-Jkappa
<b>EBNA3C (ou EBNA6)</b>	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, action sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jkappa, participe à l'immortalisation
<b>EBNALP (ou EBNA5)</b>	III	Nucléaire	Cofacteur de EBNA2, interagit avec p53 et Rb
<b>LMP1</b>	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Transducteur de signaux via TRAF vers NF-KB et JNK, induit bcl2
<b>LMP2A</b>	II, III	Membranaire	Prévient la réactivation virale
<b>LMP2B</b>	II, III	Membranaire	Inconnue

## 2.2 Cycle lytique (réplication productive)

➤ Dans certaines conditions, la latence est interrompue et le cycle lytique est activé. Le génome qui était alors sous forme épisomale devient linéaire ce qui entraîne la production de particules virales infectieuses (figure 3). Le virus utilise la machinerie enzymatique virale et celle de la cellule infectée pour exprimer les protéines du cycle lytique, se répliquer et produire de nouveaux virions. L'infection des lymphocytes B par l'EBV commence par l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe gp350 avec le récepteur du complément CD21 à la surface des lymphocytes B (96). D'autres glycoprotéines virales, gp25, gp85 et gp42 forment un complexe nécessaire à la pénétration du virus dans la cellule. La protéine gp42 se lie aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (90, 133). Cette interaction initie la fusion virus-cellule, un processus nécessitant les glycoprotéines gp85/gp25 et la glycoprotéine gp110. Après cette fusion, la nucléocapside virale libérée dans le cytoplasme migre en direction des pores nucléaires et se désintègre pour laisser la molécule d'ADN viral entrer seule dans le noyau. L'ADN du virus est alors transcrit et traduit de façon séquentielle. La protéine Zebra

(protéine très précoce, gène BZLF1) est la première protéine virale exprimée et elle détermine l'entrée dans la phase lytique, en coopération avec une autre protéine très précoce, la protéine Rta (gène BRLF1). Ces protéines transactivatrices induisent l'expression des gènes précoces qui permettent la réplication du génome viral. Parmi les protéines précoces figure l'ADN polymérase virale (gène BALF5) et la thymidine kinase (gène BXLF1). Une fois que de nouvelles molécules linéaires de génome sont produites, les gènes tardifs sont transcrits et les protéines synthétisées correspondent à des protéines de structure permettant la formation de nouvelles particules virales (protéine de capsid et glycoprotéines d'enveloppe). La capsid virale est assemblée dans le noyau. Le génome est clivé et pénètre simultanément dans la capsid. Cette étape fait intervenir une protéase codée par le virus. Cette protéase, protéine d'intérêt de notre étude, est plus amplement décrite ci-dessous. Les nucléocapsides nouvellement formées migrent en direction de la surface cellulaire et rencontrent les membranes nucléaires et/ou intracytoplasmiques. Les nucléocapsides sont probablement dé-enveloppées et ré-enveloppées par des mécanismes non connus. Les cellules sont ensuite lysées et les virions libérés dans le milieu extracellulaire.

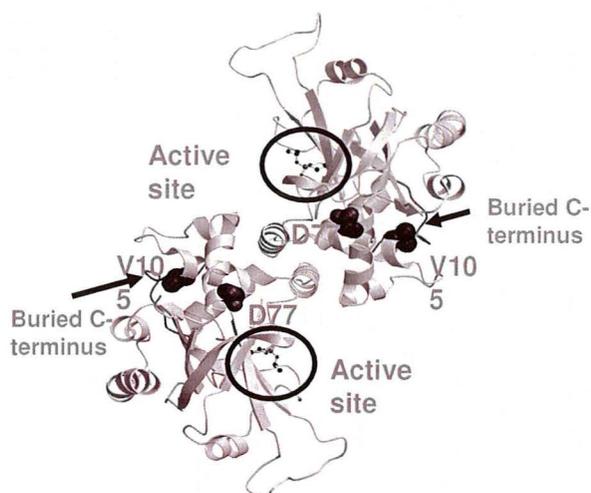


**Figure 3 : cycle de latence et cycle lytique du virus.**

L'entrée en cycle lytique est déterminée par la protéine très précoce Zebra qui entraîne la synthèse des protéines précoces (EA, early antigens), puis des protéines tardives : protéine de capsid VCA (viral capsid antigen) et glycoprotéines d'enveloppe (gp).

➤ La protéase de l'EBV est codée par le cadre de lecture BVRF2, dont le gène est traduit sous la forme d'une protéine de fusion unique comportant la protéase elle-même et le précurseur de la protéine d'assemblage. La polyprotéine précurseur de 605 acides

aminés subit une coupure à son extrémité N-terminale, libérant la forme fonctionnelle de la protéase (235 acides aminés et 26 kDa). La protéase existe sous la forme d'un équilibre dimère-monomère, la forme dimérique étant la forme active (12). Cette protéine est indispensable à la formation d'une capsid virale mature et à l'incorporation de l'ADN viral dans cette capsid. Il s'agit d'une sérine-protéase qui diffère nettement des sérine-protéases des mammifères (22). Elle pourrait donc être une cible intéressante pour le développement de nouveaux traitements anti-EBV comme cela a été fait pour le virus du Sida et de l'hépatite C. La structure tridimensionnelle de la protéase qui a été résolue par des études cristallographiques (11) est présentée ci-dessous (figure 4 ).



**Figure 4 : structure de la protéase**

### **3 Physiopathologie**

#### **3.1 Transmission**

La transmission de l'EBV se fait essentiellement par la salive et les autres modes de contamination sont moins connus. La transmission de l'EBV lors des greffes d'organes ou de moelle osseuse n'est pas rare chez les jeunes enfants transplantés, souvent séronégatifs pour l'EBV. L'EBV a été détecté dans les sécrétions génitales de sujets sains EBV-séropositifs (118) mais la transmission sexuelle de l'EBV reste controversée. Des cas de contamination par transfusion ont également été rapportés.

### 3.2 Cellules cibles

S'il est admis que les lymphocytes B sont le site de persistance du virus, la nature des cellules cibles au moment de la primo-infection est encore discutée. Certains auteurs ont proposé que les cellules épithéliales seraient la première cible de l'EBV et auraient un rôle majeur dans la réplication virale. Il existe en effet une réplication virale dans les cellules épithéliales au cours de la leucoplasie orale chevelue et dans le carcinome du nasopharynx ; cette réplication a également été observée dans des biopsies post mortem de tissu de langue de porteurs sains (57). Cependant, chez l'immunocompétent, les techniques d'hybridation *in situ* n'ont pas permis de mettre en évidence la présence du virus dans des cellules d'amygdale de malades atteints de mononucléose infectieuse (MNI) (59). De plus, les patients atteints de l'agammaglobulinémie liée à l'X, déficit immunitaire héréditaire caractérisé par une absence de maturation des précurseurs des lymphocytes B, ne sont pas infectés par l'EBV (36). Pour certains, la liaison du virus aux lymphocytes B présents dans l'oropharynx aurait un rôle facilitant l'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales : l'infection dans les cellules épithéliales serait 1000 fois plus efficace si le virus se lie d'abord à la surface d'un lymphocyte B (114). Pour d'autres, l'infection des cellules épithéliales serait un événement transitoire ayant lieu pendant la période d'incubation silencieuse de la MNI, ce qui expliquerait que le virus n'est plus retrouvé dans les cellules épithéliales au moment où les symptômes se déclarent (9). Les mécanismes par lesquels l'EBV atteint les lymphocytes mémoires à partir de la salive ainsi que le rôle des cellules épithéliales dans la physiopathologie de l'infection sont donc encore discutés (37).

### 3.3 Réponse immunitaire

Au moment de la phase aigüe de la MNI, les lymphocytes B infectés par l'EBV augmentent et peuvent représenter jusqu'à 20% des lymphocytes B circulants. Cette prolifération prend rapidement fin et la charge virale plasmatique revient à un niveau normal en deux semaines (34). L'infection est contrôlée grâce à l'intense réponse immunitaire qui se caractérise par une expansion importante des cellules T CD8+ (5 à 20 fois), les cellules T CD4+ et les cellules NK activées étant moins nombreuses. Des taux élevés de cytokines sont également détectés (interleukines 1, 2, 6 et 10). La charge virale dans les cellules mononuclées sanguines diminue progressivement sans se négativer au cours du premier mois et atteint les valeurs observées chez le sujet sain au bout de 6 mois (34). Le nombre de lymphocytes infectés par l'EBV se stabilise au taux de 1 à 50 cellules

infectées par l'EBV pour  $10^6$  lymphocytes B circulants. Ce taux reste stable chez les porteurs asymptomatiques. Ces cellules appartiennent à la fraction IgD-, CD27+ des cellules B mémoires et sont majoritairement des cellules en phase  $G_0$  dépourvues de marqueurs de prolifération. L'expression antigénique de ces lymphocytes mémoires est restreinte, ce qui permet à l'EBV d'échapper à la surveillance du système immunitaire et de persister dans ces lymphocytes. Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie dans l'organisme, le plus souvent sans aucune conséquence pathologique pour l'hôte infecté. Une production de particules virales infectieuses est observée de manière intermittente dans la salive durant toute la vie de l'individu. Ainsi on peut parler de persistance asymptomatique du virus mais la présence du génome de l'EBV et de certaines protéines de latence du virus est également associée au développement de certains cancers.

### **3.4 Transformation cellulaire**

Il est admis que certaines protéines de latence, douées de propriétés transformantes ou anti-apoptotiques, sont les principales responsables de l'association entre EBV et cancers. Un certain nombre d'arguments mettent également en cause une partie des protéines du cycle lytique dans la physiopathologie du lymphome de Burkitt, du carcinome du nasopharynx et de certaines lymphoproliférations chez l'immunodéprimé. L'ARN messager de la gp350 a été retrouvé de façon inconstante dans des biopsies de carcinome du nasopharynx (NPC) ou de syndrome post-transplantation (45). Plusieurs équipes ont rapporté qu'un cycle productif complet pouvait exister dans les lymphomes post-transplantation, les lymphomes de Burkitt et les carcinomes du nasopharynx (38, 63). De plus, des études récentes en culture de cellules et chez l'animal ont mis en évidence l'importance du cycle lytique de l'EBV dans les maladies liées à l'EBV par induction de cytokines induisant la prolifération lymphoïde (60, 61). Des études séro-épidémiologiques ont également montré la présence de titres élevés d'anticorps contre des protéines du cycle lytique avant ou lors de l'émergence des lymphomes de Burkitt et des carcinomes du nasopharynx (144). Enfin, il existe des cas rapportés de guérison de syndromes lymphoprolifératifs chez l'immunodéprimé après l'utilisation de molécules antiherpétiques (109, 110).

## 4 Pathologies associées au virus d'Epstein Barr

### 4.1 Primo infection EBV et mononucléose infectieuse

Le virus d'Epstein-Barr infecte la grande majorité de la population mondiale, souvent sous la forme d'une infection asymptomatique chez l'enfant. Chez l'adolescent et l'adulte jeune, cette primo-infection s'accompagne fréquemment d'un ensemble de signes cliniques que l'on regroupe sous le terme de mononucléose infectieuse (MNI).

#### *a Historique de la mononucléose infectieuse*

Le terme mononucléose infectieuse a été utilisé pour la première fois en 1920, pour décrire les symptômes présentés par 6 patients hospitalisés pour fièvre, angine et adénopathies, avec présence de lymphocytes circulants anormaux faisant suspecter une leucémie. Ces lymphocytes atypiques ont été caractérisés par la suite, permettant de définir la MNI comme une entité clinique distincte de la leucémie aiguë. Du point de vue étiologique, *Listeria monocytogenes* et *Toxoplasma gondii* ont d'abord été incriminés puis disqualifiés. En 1955, Hoagland avait observé un pic de MNI chez les étudiants de l'US Military Academy, environ 6 semaines après leur retour de vacances (33). Il fut alors suggéré que la MNI se transmettait par la salive lors du baiser. Puis dans les années 1960, des chercheurs ont montré que les anticorps dirigés contre l'EBV étaient détectables chez les africains atteints de lymphome de Burkitt mais aussi dans 85% de la population adulte des Etats-Unis. En 1968, le mystère fut levé lorsqu'un technicien de leur laboratoire séronégatif pour l'EBV développa une MNI, son sérum devenant positif après la maladie. L'EBV fut reconnu comme l'agent causal de la MNI.

#### *b Epidémiologie*

Plus de 95% de la population mondiale adulte est infectée par l'EBV. Cette prévalence importante est due à la transmission salivaire précoce et aux périodes d'excrétion salivaire au décours de la primo-infection et pendant la phase d'infection persistante dans l'organisme. L'incidence de la MNI varie avec l'âge et les conditions socio-économiques. Dans la population générale, les adolescents et les adultes jeunes sont plus susceptibles que les enfants de présenter un tableau clinique de MNI lors de la primo-infection à EBV. Ceci peut s'expliquer par le concept de l'immunité hétérologue (123). Quand l'infection à EBV

survient chez les enfants, il existe une grande réserve de lymphocytes T naïfs capables de contrôler rapidement l'infection. Avec l'âge, cette réserve est moins grande, et l'organisme sollicite les lymphocytes T hétérologues (déjà stimulés) qui, pour être efficaces, nécessitent une activation beaucoup plus importante, ce qui entraîne une réponse inflammatoire massive responsable des symptômes de la MNI.

### *c Clinique*

La MNI classique se caractérise par de la fièvre, angine ou rhinopharyngite, polyadénopathies et asthénie prolongée après une période d'incubation de 4 à 8 semaines. En plus des symptômes classiques, des malaises et céphalées ont été rapportés dans 50% des cas. Dans une moindre mesure peuvent survenir toux, arthralgies, myalgies et somnolence. La splénomégalie est rapportée dans plus de 50% des cas. Le rash maculopapuleux qui est parfois observé est souvent dû à un traitement antibiotique empirique administré devant une angine fébrile (béta-lactamines le plus souvent).

Dans de rares cas, la MNI peut se compliquer par des manifestations aiguës ou chroniques graves (tableau II). Parmi les complications classiques figurent des atteintes hématologiques telles que neutropénie, thrombopénie et anémie hémolytique, une atteinte hépatique avec ictère et transaminases élevées ou encore des complications neurologiques (méningite aseptique, encéphalite, syndrome de Guillain-Barré, névrite optique ou périphérique, myélite) guérissant sans séquelles. Parmi les complications plus rares figurent pancytopénie, rupture splénique, pneumonie interstitielle, rhabdomyolyse et syndrome hémophagocytaire. Ce dernier syndrome souvent fatal se caractérise par une fièvre persistante et une hépatosplénomégalie accompagnées de cytopénie et coagulopathie. Il existe une stimulation inappropriée des cellules macrophagiques dans la moelle osseuse et le système lymphoïde, ce qui entraîne une phagocytose anormale des éléments figurés du sang et la libération de cytokines pro-inflammatoires.

Le syndrome de Purtilo ou syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X survient chez les jeunes garçons au décours d'une primo-infection à EBV. Ce syndrome se caractérise par une altération de l'immunosurveillance de l'EBV et se manifeste par une MNI typique avec fièvre, adénopathies et hépatosplénomégalie, qui évolue rapidement vers une hépatite fulminante accompagnée d'une aplasie médullaire entraînant la mort dans 40% des cas. Il se manifeste aussi dans 25% des cas d'emblée par un lymphome B non hodgkinien. Ce syndrome est causé par un défaut situé au niveau d'un gène localisé sur le

chromosome X dans la région Xq25, gène qui code pour une protéine intervenant dans les mécanismes physiologiques d'activation lymphocytaire T. Il en résulte une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV.

L'infection chronique active à EBV est définie comme une infection chronique ou une mononucléose récurrente grave dont les symptômes persistent plus d'un an. C'est une affection rare qui survient chez le sujet immunocompétent avec une fréquence plus élevée au Japon.

**Tableau II : complications aiguës potentiellement graves des MNI (35)**

Complications	Fréquence
Rupture de rate	< 0,5 % . plus fréquent chez adulte que chez l'enfant
Troubles respiratoires par obstruction des voies aériennes supérieures	< 5 % . plus fréquent chez le sujet jeune . une des causes les plus fréquentes d'hospitalisation
Troubles neurologiques : - encéphalite ou méningo-encéphalite - cérébellite - trouble psychiatrique (hallucinations, syndrome d'Alice au pays des merveilles) - atteinte nerf crânien (névrite optique, paralysie faciale, surdité) - myélite transverse - mono, multi, polynévrite	< 5 % rare
Troubles hématologiques : - anémie hémolytique - anémie aplastique - thrombopénie sévère (< 20 000 /mm <sup>3</sup> )* - neutropénie sévère (<1 000 /mm <sup>3</sup> ) ou agranulocytose* - pancytopénie - syndrome d'activation macrophagique	< 5 % rare
Divers : - ictère - hépatite fulminante** - pneumopathies ou pleurésie - atteintes cardiaques (myocardite, péricardite) - rhabdomyolyse - insuffisance rénale aiguë	rare

\* Une thrombopénie et/ou une neutropénie modérée et transitoire sont présentes dans 50 % des cas.

\*\* Une cytolysé hépatique modérée est présente dans 50 à 80 % des cas de MNI.

## 4.2 Persistance de l'EBV et maladies associées

Après la primo-infection, l'EBV persiste toute la vie dans l'organisme le plus souvent sans aucune conséquence pathologique apparente pour l'hôte infecté. Cependant, le génome viral et certaines protéines de latence impliquées dans la transformation cellulaire sont retrouvés avec une grande fréquence dans des lymphomes et des carcinomes chez l'homme : on parle de cancers associés à l'EBV. Certains de ces cancers surviennent chez l'immunocompétent, d'autres chez l'immunodéprimé. Il existe également un cas particulier d'infection chronique entraînant une production de virions, la leucoplasie orale chevelue.

## *a Chez l'immunocompétent*

### ◆ **Lymphome de Burkitt**

Le lymphome de Burkitt correspond à la prolifération maligne d'un clone de lymphocytes B, le plus souvent chez l'enfant. Deux formes existent : une forme endémique en Afrique noire associée à l'EBV dans 96% des cas et se présentant sous la forme d'une tumeur maxillaire, une forme sporadique en Europe et aux Etats-Unis, associée au virus dans seulement 15 à 25% des cas et se développant le plus souvent au niveau de l'abdomen. Il existe une translocation pathognomique qui juxtapose l'oncogène *c-myc* (situé en 8q24) près du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (situé en 14q32).

Les critères d'association de cette tumeur à l'EBV reposent sur la présence d'ADN viral et d'antigènes de latence dans les cellules cancéreuses, et sur l'existence de titres élevés d'anticorps contre les antigènes de capsid VCA (viral capsid antigen) et les antigènes précoces EA (early antigen). La latence observée dans le lymphome de Burkitt est de type 1, seuls l'EBNA1 et les EBER sont exprimés. Le rôle de l'EBV dans la transformation maligne du lymphome de Burkitt n'est pas complètement élucidé.

### ◆ **Maladie de Hodgkin**

La maladie de Hodgkin est un type de lymphome caractérisé par la présence de grosses cellules atypiques, les cellules de Reed-Sternberg. Ces cellules sont des cellules lymphoïdes d'origine B, dérivées des cellules post-centre germinatif ayant des réarrangements clonaux mais anormaux des gènes des immunoglobines. Il existe deux formes de la maladie en fonction de l'organisation du tissu réactionnel : la maladie de Hodgkin classique (95% des cas) et la maladie de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire. Trente à quarante pour cent des maladies de Hodgkin classiques contiennent le génome EBV à l'état clonal dans les cellules de Reed-Sternberg alors que le virus est toujours absent des formes nodulaires à prédominance lymphocytaire (136). Des titres élevés d'anticorps anti-EBV (anti-EA et anti-VCA) ont été détectés au cours de cette maladie (92). Dans les maladies de Hodgkin associées à l'EBV, 3 protéines de latence de l'EBV sont exprimées dans les biopsies ganglionnaires : EBNA1, LMP1 et LMP2 ce qui correspond à une latence de type II.

### ◆ Carcinome du nasopharynx

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est un cancer se développant à partir des cellules épithéliales du nasopharynx. Ce cancer est très fréquent en Chine, moins en Afrique du nord et rare en Europe ou aux Etats-Unis ; il atteint plutôt l'adulte. Le génome complet de l'EBV est détecté à l'intérieur des cellules tumorales dans 100% des biopsies de NPC. Le rôle de l'EBV dans le développement de ce cancer a été évoqué du fait de la clonalité des souches virales dans les cellules tumorales et de la présence de titres élevés d'anticorps IgA anti-VCA et anti-EA. Des facteurs génétiques et environnementaux interviennent également dans la genèse de la tumeur.

#### *b Chez l'immunodéprimé*

Deux types d'immunodépression peuvent conduire au développement de pathologies associées à l'EBV : l'immunodépression induite par le traitement immunosuppresseur chez les greffés et l'immunodépression liée au VIH.

### ◆ Chez le transplanté : Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT) inclut par définition toutes les lymphoproliférations qui surviennent après une greffe d'organe ou de moelle osseuse. Cette complication survient le plus souvent dans l'année suivant la greffe (24). Entre 80 à 90% de ces tumeurs sont associées à l'EBV qui est le facteur étiologique prédominant. Ces SLPT se présentent sous un large spectre morphologique. L'incidence des SPLT dépend essentiellement du type de tissu greffé, du statut immunitaire du couple receveur-donneur, de l'âge du receveur, de l'existence d'infections virales associées (cytomégalovirus), et du type d'immunosuppresseurs anti-rejet utilisés (20). La primo-infection chez un receveur EBV-séronégatif greffé avec un greffon d'un donneur séropositif est un facteur de risque important : lors des greffes d'organe, les greffés EBV-séronégatifs présentent un risque de SLPT 10 à 76 fois plus élevé que les greffés EBV-séropositifs. Ceci explique la grande fréquence de SLPT précoces chez les enfants qui bénéficient d'une greffe d'organe (58). La physiopathologie des SLPT est complexe. La déficience de l'immunité cellulaire anti-EBV en est la cause. Ce déficit est provoqué par le traitement immunosuppresseur administré pour la prévention du rejet de greffe. Dans le cas des greffes de moelle osseuse, le déficit est provoqué par les fortes doses de radiothérapie et/ou chimiothérapie, par la

déplétion du greffon en cellules T et par le traitement immunosuppresseur contre la maladie de la réaction du greffon contre l'hôte. Le type de latence qui est observé dans les SLPT est une latence de type III avec expression de toutes les protéines de latence.

◆ **Chez le patient VIH positif**

➤ *Lymphomes associés à l'EBV*

Chez le patient VIH positif (VIH+), les individus infectés par l'EBV ont un risque particulier de développer des lymphomes des cellules B mais le spectre des types de tumeur est plus large que chez les transplantés. La force de l'association entre EBV et tumeur diffère en fonction du type de la tumeur. Parmi ces tumeurs figure un groupe de lymphomes analogues à ceux retrouvés chez les transplantés, ces lymphomes surviennent à un stade tardif de l'infection par le VIH, quand l'immunodépression est profonde. C'est le cas du lymphome immunoblastique à grandes cellules et de certains lymphomes du système nerveux central. Le génome de l'EBV est détecté dans 90% des tumeurs immunoblastiques. Plusieurs types de latence peuvent co-exister dans ces tumeurs immunoblastiques. D'autres types de lymphomes existent, plus rares et avec une association inconstante à l'EBV : le lymphome plasmablastique et le lymphome primitif des séreuses. Enfin il existe deux autres types de lymphomes chez le sujet VIH+ qui sont des formes particulières de lymphomes existant chez l'immunocompétent : le lymphome de Burkitt et le lymphome de Hodgkin du sujet VIH+.

➤ *La leucoplasie orale chevelue*

Identifiée initialement chez des patients VIH, la leucoplasie orale chevelue se manifeste par des lésions de couleur blanche sur la langue. Certains cas ont également été décrits lors d'une immunosuppression après greffe d'organe. Cette pathologie est un cas unique d'infection productive chronique de cellules épithéliales par l'EBV. En effet dans les cellules infectées, une répllication active du virus a pu être mise en évidence (détection de génomes viraux linéaires et de protéines du cycle lytique). La plupart des lésions répondent bien à des hautes doses de valaciclovir (132).

## 5 Traitements antiviraux disponibles

Les antiviraux actuels se sont révélés inconstamment efficaces pour le traitement des maladies associées à l'EBV.

Les antiviraux candidats sont principalement les inhibiteurs de l'ADN polymérase virale. Ces inhibiteurs sont les analogues de nucléosides et leur prodrogues (aciclovir et valaciclovir, ganciclovir et valganciclovir), les analogues de nucléotides (cidofovir) et les analogues de pyrophosphate (acide phosphonoformique). Les analogues de nucléosides doivent être phosphorylés pour être actifs. La première phosphorylation se fait par une kinase virale, ce qui implique une action limitée aux cellules infectées. Deux autres phosphorylations sont effectuées par des kinases cellulaires. L'EBV code pour deux protéines kinases, une thymidine kinase (gène BXLF1) et une sérine protéine kinase (gène BGLF4). Ces deux enzymes du cycle lytique pourraient contribuer à l'activation des analogues de nucléosides. Une fois phosphorylés, ces analogues sont incorporés dans l'ADN par l'ADN polymérase virale et bloquent l'élongation de l'ADN viral. Le cidofovir a un mécanisme d'action identique, avec seulement deux phosphorylations par des kinases cellulaires. Le foscarnet présente un mécanisme d'action différent, en inhibant l'ADN polymérase virale de façon non compétitive par liaison au site de fixation du pyrophosphate.

Dans le cas de la MNI, les essais cliniques réalisés avec les antiviraux, principalement l'aciclovir n'ont pas été concluants (125, 128). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène. La phase symptomatique de l'infection est précédée d'une longue période d'incubation pendant laquelle le virus se réplique activement. A ce stade le virus est retrouvé principalement dans la salive et les concentrations des antiviraux dans la cavité buccale ne sont pas optimales (125, 128). De plus, les signes cliniques de la MNI sont dus principalement à la forte réaction immunitaire, les lymphocytes activés pouvant représenter jusqu'à 40% des lymphocytes totaux circulants. Les corticoïdes ont été utilisés de façon empirique pour traiter certaines formes sévères de MNI. Une étude a rapporté l'utilisation de la prednisolone en association avec l'aciclovir, mais cette association n'a pas entraîné d'amélioration clinique (126). Dans une étude plus récente, 20 étudiants présentant une MNI ont été randomisés pour recevoir du valaciclovir ou non pendant 15 jours. Les sujets traités ont présenté des charges virales dans le sang et la salive plus basses que les sujets non traités mais ces résultats doivent être confirmés sur une population plus importante (5).

Le bénéfice clinique lié à l'utilisation du valaciclovir n'a pas été montré de manière probante.

Certaines manifestations cliniques associées à l'EBV ont été traitées efficacement avec les antiviraux. Le ganciclovir a été utilisé avec succès chez deux patients immunocompétents présentant une hépatite sévère liée à l'EBV (1). Douze patients atteints d'un syndrome de fatigue chronique lié à l'EBV ont reçu un traitement par valganciclovir pendant 6 mois, entraînant chez 9 patients une amélioration des signes cliniques et une réduction du titre des anticorps associés à l'EBV (72). Chez un enfant présentant une maladie pulmonaire chronique liée à l'EBV (présence du virus dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire et dans une biopsie de poumons), un traitement parentéral de 10 jours par ganciclovir suivi d'un traitement oral de 20 jours par l'acyclovir a permis d'obtenir une disparition de la symptomatologie clinique (101). Les antiviraux ont été efficaces dans le traitement de la leucoplasie orale chevelue même si des rechutes peuvent survenir quelques mois après le traitement (52, 94).

Les antiviraux actuels n'ont pas fait la preuve d'une réelle efficacité dans le cas des maladies malignes associées à l'EBV. Une des raisons expliquant la faible efficacité des analogues nucléosidiques est que la majorité des cellules tumorales infectées par l'EBV portent le génome sous sa forme latente alors que les kinases et la polymérase virale (BXLF1 et BGLF4) sont des enzymes exprimées pendant le cycle lytique du virus. Quelques cas de succès thérapeutique ont cependant été rapportés. Deux encéphalites survenant dans le contexte d'un SLPT ont été traitées avec succès par l'administration de ganciclovir par voie parentérale suivie par un traitement oral (6, 84). Le ganciclovir a permis de diminuer la charge virale du virus d'Epstein Barr dans le LCR de 8 patients présentant un lymphome cérébral lié au VIH par rapport à 15 patients non traités par le ganciclovir. Une amélioration de la survie a été observée chez les patients traités par le ganciclovir (10).

Les autres molécules ciblant l'ADN polymérase ont été moins utilisées dans le cadre des infections à EBV. Le cidofovir, analogue de la cytidine, a été utilisé dans des modèles murins de carcinome du nasopharynx où il a entraîné une réduction de la croissance tumorale par augmentation de l'apoptose. Son action apoptotique a pu être potentialisée par les inhibiteurs de la ribonucléotide réductase (93, 131). Le foscarnet a permis une régression tumorale complète chez deux patients immunodéprimés présentant des

syndromes lymphoprolifératifs (110) et sa suppression chez un malade VIH positif a entraîné le développement d'une maladie de Hodgkin liée à l'EBV (111).

Une autre stratégie en cours d'évaluation consiste à utiliser simultanément un inducteur du cycle lytique et un analogue de nucléoside. L'induction du cycle lytique dans les cellules infectées de façon latente par l'EBV permet l'expression de la thymidine kinase virale. L'analogue de nucléoside est alors plus efficace. Plusieurs composés, principalement des agents anticancéreux, peuvent être utilisés pour induire le cycle lytique. Dans deux études, l'association arginine butyrate-ganciclovir a permis d'obtenir une amélioration clinique pour 4 des 6 patients de la première étude et pour 10 des 15 patients dans la deuxième (89, 99). L'équipe de Feng a montré qu'il était possible d'induire le cycle lytique par plusieurs agents anticancéreux, tels que la doxorubicine ou la gemcitabine et que leur utilisation conjointe avec le ganciclovir *in vivo* chez la souris était plus efficace que l'utilisation des anticancéreux seuls ou du ganciclovir seul. Cette étude a conclu que le ganciclovir pourrait augmenter l'effet thérapeutique de certains agents anticancéreux dans le traitement des lymphoproliférations associées à l'EBV (39). L'association *in vivo* chez la souris d'un corticoïde (la dexaméthasone) et de l'anticorps monoclonal chimérique rituximab permet d'obtenir une synergie d'action pour induire le cycle lytique et donc une sensibilisation des cellules infectées par l'EBV au ganciclovir (25).

Ces données montrent qu'il est nécessaire de rechercher de nouvelles stratégies qui seraient plus efficaces dans le traitement des cancers associés à l'EBV. D'autres molécules telles que le maribavir, l'iododioxolaneuracile et l'indocarbazole sont en cours d'évaluation (46, 47, 71). Le mécanisme d'action de ces molécules est encore à l'étude. Une autre stratégie envisageable consisterait en l'administration de siRNA (small interfering RNA) qui entraînent une inhibition spécifique de l'expression de gènes viraux par le mécanisme d'ARN interférence.

## II L'ARN interférence

---

L'ARN interférence est un mécanisme de défense cellulaire déclenché par l'introduction d'ARN double brin (ARNdb) dans la cellule. Il s'agit d'un système d'extinction de l'expression d'un gène par inhibition du processus post-transcriptionnel (post transcriptionnal gene silencing ou PTGS). Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont reçu le 2 octobre 2006 le prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux concernant cette découverte.

### 1 Historique de l'ARN interférence

Le phénomène d'ARN interférence a été découvert de manière fortuite par des botanistes travaillant sur les mécanismes moléculaires de la coloration des fleurs de pétunia (figure 5). En 1990, Jorgensen cherche à intensifier la couleur des pétunias en ajoutant par transgénèse au génome de la plante des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase (CHS), responsable de la coloration des fleurs. Contre toute attente, il observe que les fleurs obtenues sont soit entièrement blanches, soit décolorées, soit blanches mouchetées de violet. L'excès du gène et par conséquent de l'ARN messager (ARNm) correspondant à l'enzyme avait provoqué chez la plante hôte un phénomène correcteur qui consistait à rendre silencieux non seulement l'ADN injecté mais aussi l'ADN endogène codant pour la chalcone synthase. Le phénomène fut alors qualifié de « co-suppression » (95).



*Fleur sauvage*

*Fleur obtenue après  
introduction du transgène*

*Fleur obtenue après  
introduction du transgène*

**Figure 5 : phénotypes de la plante sauvage et des plantes transgéniques obtenus après introduction du gène CHS**

En 1998, ce phénomène fut à nouveau observé dans le règne animal par les études menées par le groupe d'Andrew Fire chez le nématode *C.elegans* (21, 40). Identifié sous le nom de post transcriptionnal gene silencing (PTGS) chez les plantes, ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par l'introduction d'ARN homologue, fut alors appelé ARN interférence. L'équipe d'Andrew Fire a montré que l'introduction d'ARN dans des cellules pouvait interférer avec la fonction d'un gène endogène et réduire spécifiquement l'expression des protéines.

Jusqu'en 2001, toutes les tentatives pour transposer cet outil dans les cellules de mammifères se sont révélées infructueuses. En effet chez les mammifères, l'introduction d'un long ARN double-brin (ARNdb) déclenche une forte réaction antivirale non spécifique, appelée réponse interféron. Les cellules détectent l'ARN viral grâce à des senseurs cytoplasmiques et membranaires ce qui entraîne une production d'interféron de type I. Deux mécanismes interviennent dans cette réponse : l'induction de la 2'-5' adénylate synthétase et l'activation de la protéine kinase PKR. L'activation de ces voies bloque la synthèse des protéines cellulaires et provoque une dégradation non spécifique des ARN messagers. En 2001, l'équipe d'Elbashir et Tuschl a montré que l'introduction dans les cellules de mammifères de petits ARNdb de séquence homologue à celle d'un ARN endogène conduisait à la dégradation de ce dernier sans déclencher la production d'interféron (29). La taille de ces oligoribonucléotides correspond à celle des produits de clivage des grands ARNdb observés chez les plantes lors du processus d'ARN interférence. Ces oligonucléotides, d'une taille de l'ordre d'une vingtaine de nucléotides, sont maintenant appelés small interfering RNA (siRNA). Ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par des ARNdb, a donc été retrouvé chez les mammifères, les plantes et les eucaryotes et atteste d'un mécanisme très conservé (68).

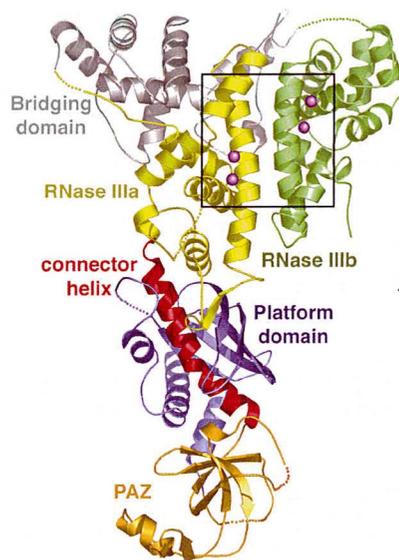
## **2 Mécanisme de l'ARN interférence (figure 7)**

Le phénomène d'ARN interférence est un mécanisme se déroulant en plusieurs temps dans le cytoplasme. Le processus est déclenché lors de l'introduction d'un ARNdb étranger à l'intérieur de la cellule et comprend deux étapes distinctes : la phase d'initiation et la phase effectrice. Une phase d'amplification est parfois présente.

➤ La phase d'initiation

Elle correspond au clivage de l'ARNdb en petits ARNdb d'une vingtaine de nucléotides environ, appelés siRNA. L'enzyme Dicer responsable de cette première étape, appartient à la famille des RNase III, dont l'activité nucléasique s'exprime uniquement sur des ARN double-brins (8). Cette enzyme, très conservée tant chez le nématode *C. elegans* que chez les mammifères possède (figure 6) :

- un domaine ARN hélicase dans sa région N-terminale
- un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)
- deux domaines RNase III
- un motif de liaison à l'ARNdb dans sa région C-terminale



**Figure 6 : structure de l'enzyme Dicer**

Les fragments produits ont la particularité de présenter à chaque extrémité 3' deux nucléotides libres (non appariés). L'enzyme Dicer n'agit pas sur une séquence spécifique mais sur tout ARNdb et génère des fragments de taille identique.

➤ La phase effectrice

La phase effectrice met en jeu une activité nucléasique et aboutit à la dégradation de l'ARNm ciblé. L'ARN double-brin produit par Dicer est reconnu par un complexe enzymatique dénommé RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), doté d'activités hélicases ATP-dépendante et RNase. Ces activités enzymatiques permettent le positionnement et

l'alignement séquence spécifique du siRNA sur l'ARN messenger cible, puis sa coupure. Le complexe RISC a été identifié à partir d'embryons de drosophile sous la forme d'un complexe précurseur de 250 kDa par le groupe de Zamore (85). Son fonctionnement et ses composants ne sont pas encore très bien caractérisés. Ce complexe comprendrait :

- une protéine de la famille des argonautes avec domaines PAZ
- une hélicase ATP-dépendante permettant de dissocier l'ARNdb
- des nucléases
- des motifs de liaison à l'ARN

Les siRNA résultant de la coupure par Dicer sont incorporés dans RISC et servent de guide pour la reconnaissance de l'ARN cible. Le complexe RISC s'active par interaction avec Dicer grâce à son domaine argonaute, ce qui provoque une dissociation des deux brins du siRNA par l'activité hélicase du complexe. Une fois activé, RISC est guidé par le siRNA vers l'ARNm auquel il se fixe, ce qui entraîne sa dégradation. L'ARNm ainsi fragmenté en ARNdb d'une vingtaine de nucléotides ne peut plus donner lieu à un processus de traduction. L'effet final, appelé ARN interférence (ARNi) est donc équivalent à l'inactivation d'un gène de manière spécifique, puisque dépendant de la séquence de l'ARNdb introduit dans la cellule.

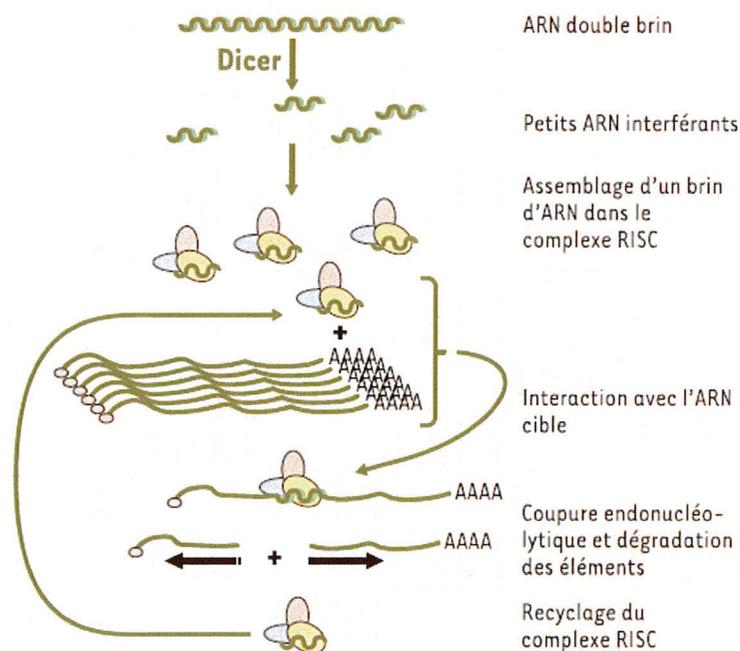


Figure 7 : mécanisme de l'ARN interférence, schéma simplifié (27).

➤ phase d'amplification (figure 8)

Chez les nématodes, l'inhibition de l'expression d'une protéine par le phénomène d'ARN interférence ne semble exiger qu'une très faible quantité initiale d'ARNdb. On suppose donc qu'il existe une étape d'amplification dans le phénomène d'ARN interférence. L'enzyme RdRP (RNA-directed RNA polymérase) permet chez les nématodes d'augmenter l'efficacité d'interférence de l'ARN. Cette enzyme peut synthétiser un siRNA secondaire à partir de l'extrémité 3'OH du siRNA primaire servant d'amorce sur l'ARNm, ce qui aboutit à la formation d'un nouvel ARNdb pouvant être utilisé comme substrat par Dicer et donc une amplification du signal. Ce mécanisme n'existe pas chez les mammifères, l'enzyme RdRP étant absente (121). Une autre raison pouvant expliquer l'existence d'une boucle d'amplification chez les nématodes et son absence chez les mammifères est l'absence de réponse de type interféron chez les nématodes, à la différence des mammifères.

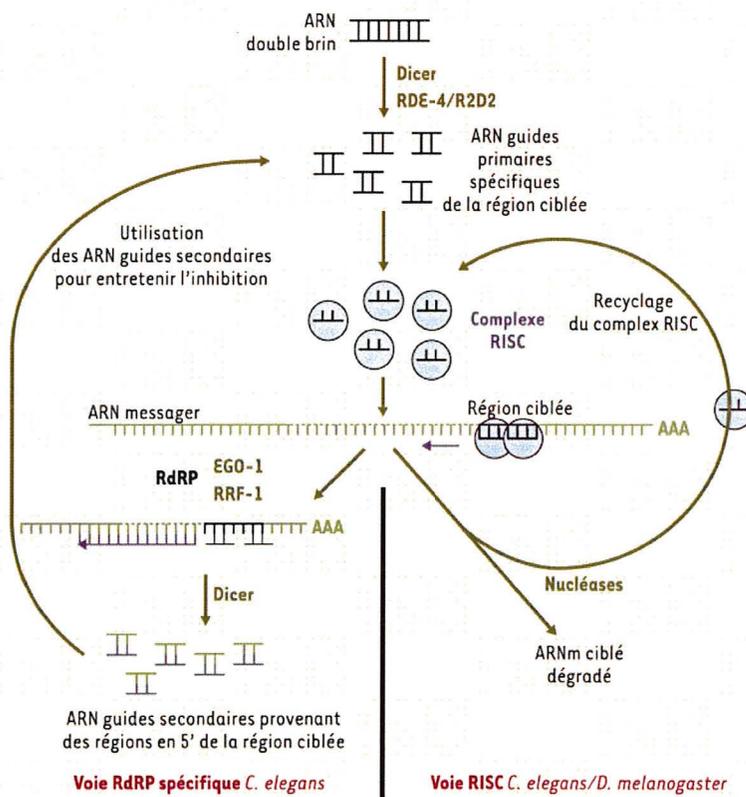


Figure 8 : boucle d'amplification chez le nématode (27).

### **3 Rôles de l'ARN interférence**

#### **3.1 Outil expérimental**

Depuis sa découverte, l'ARN interférence suscite un intérêt croissant de la part des biologistes et est devenue une technique de base utilisée par les biologistes de toute discipline. L'ARN interférence tend à remplacer les méthodes traditionnelles de la génétique pour étudier la fonction des gènes (30, 64, 87, 117). Les chercheurs s'intéressent maintenant à ce phénomène pour l'utiliser dans des applications thérapeutiques (69, 78). Ces dernières années, de nombreuses publications ont rapporté des essais d'ARN interférence dans le domaine de la cancérologie et des maladies infectieuses virales.

#### **3.2 Activité antivirale**

➤ L'ARN interférence est un mécanisme conservé qui protège le génome cellulaire d'éléments génétiques étrangers tels que les virus et les transposons. La plupart des virus, y compris les virus à ADN produisent des ARNdb au cours de la réplication virale. Ces ARNdb sont dégradés par Dicer en siRNA. Il a été montré chez les plantes que lorsque la machinerie cellulaire impliquée dans l'ARN interférence est déficiente, la réplication virale augmente. Les virus ont par ailleurs développé des protéines fonctionnant comme des suppresseurs de l'ARN interférence (tableau III) (104, 108). Chez les plantes, la protéine p19 du tombavirus se lie au siRNA inhibant son incorporation dans le complexe RISC et la protéine de capsid du turnip crinckle virus (TCV) supprime l'ARN interférence à une étape précoce, en interférant avec la réaction de clivage par Dicer (104). De façon similaire, les virus infectant les vertébrés et les invertébrés ont développé des stratégies pour lutter contre le phénomène d'ARN interférence. La protéine B2 du flock house virus inhibe l'ARN interférence par un mécanisme inconnu chez la drosophile. La protéine NS1 du virus influenza et la protéine E3L du virus de la vaccine peuvent inhiber le processus dans des cellules de drosophile (81). Ces deux protéines, ainsi que la protéine VA1 de l'adénovirus, la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine ou la protéine B2 du nodamuravirus, ont également montré une activité suppressive du phénomène d'ARN interférence dans des cellules de mammifères, suggérant que le système de l'ARN interférence pourrait avoir un rôle dans la lutte antivirale similaire à ce qui a été décrit chez les plantes (3, 7). Cependant, l'activité de ces suppresseurs a été observée dans des systèmes hétérologues et non dans des conditions physiologiques. Bien qu'il soit possible

d'utiliser les siRNA en tant qu'outil artificiel pour inhiber la réplication virale dans des cellules humaines, il est encore incertain que cette réponse soit sollicitée de façon naturelle chez les mammifères et il n'existe pas de données expérimentales solides qui appuieraient l'idée d'un rôle antiviral par le « RNA silencing ». Le clonage et le séquençage de manière extensive de petits ARN isolés de cellules infectées par des virus à ARN tels que le virus de l'hépatite C, de la fièvre jaune ou du sida n'ont pas permis d'identifier des siRNA d'origine virale dans ces cellules, alors que ceux-ci sont présents en grande quantité dans les tissus infectés chez les plantes et les insectes.

**Tableau III : suppresseurs du RNA silencing (112)**

Suppressors of RNA silencing (SRS) and their effects on double-stranded RNA activated protein kinase PKR in mammalian cells					
SRS	Virus	Viral family	Genome	Comments	PKR inhibition
NS1	Influenza A/B/C	Orthomyxovirus	ssRNA (-)	SRS function shown in insect cells	Yes
E3L	Vaccinia virus	Poxvirus	dsDNA	SRS function shown in insect cells	Yes
B2	Nodamura virus	Nodavirus	ssRNA (+)	Inhibition of Dicer-mediated cleavage by binding to dsRNA precursors	?
NSs	La Crosse virus	Bunyavirus	ssRNA (-)	Inhibition of Dicer-mediated cleavage	?
Tat	HIV-1	Retrovirus	ssRNA (+)	Inhibition of Dicer-mediated cleavage	Yes
Tas	PFV-1	Retrovirus	ssRNA (+)	Inhibition of microRNA function, causes unspecific accumulation of microRNAs	?
VA RNAs	Adenovirus	Adenovirus	dsDNA	Saturation of Exportin5, Dicer and RISC	Yes

➤ De la même façon que des phénomènes de résistance sont apparus suite à l'utilisation des antiviraux, des phénomènes d'échappement viral à l'ARN interférence ont été constatés. Ces phénomènes d'échappement sont d'autant plus importants qu'ils concernent des virus à ARN, étant donné le taux d'erreur spontané de la polymérase virale. Ces phénomènes ont déjà été décrits pour plusieurs virus, une perte d'effet des siRNA a en effet été observée suite à l'utilisation de siRNA dirigés contre le VIH (26), les poliovirus (51), le VHB (139) ou le VHC (138). La plupart des mutants acquièrent une résistance par mutation ponctuelle ou délétion au niveau de la séquence cible. Certaines positions sont critiques pour la reconnaissance du siRNA au niveau de la séquence cible, les mutations affectant le centre de la séquence auraient un rôle prépondérant. Un phénomène d'échappement ne faisant pas intervenir une mutation de la séquence cible a également été décrit : des mutations situées à l'extérieur de la cible mais créant une nouvelle structure secondaire ne permettant pas la reconnaissance avec RISC ont été observées pour le VIH (137). Afin de prévenir l'émergence de ces résistances, certains pré-requis apparaissent indispensables : privilégier les régions conservées du génome, cibler plusieurs régions du génome simultanément grâce à l'association de plusieurs siRNA. Une autre alternative pourrait être de cibler des régions non traduites (régions UTR des virus à ARN par

exemple) qui contiennent des structures complexes impliquées dans des interactions avec des protéines cellulaires et virales souvent essentielles pour la réplication du virus. Cibler ces régions avec des siRNA pourrait prévenir l'émergence de résistance car des mutations ponctuelles dans ces structures pourraient conduire à une perte de fonction.

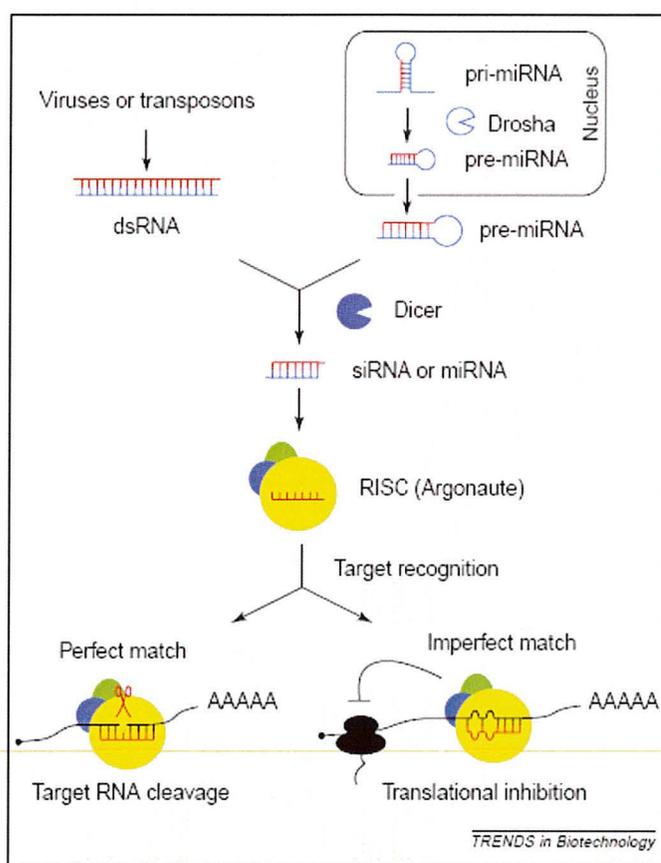
### 3.3 Régulation de l'expression du génome

L'ARN interférence est également impliqué dans d'autres processus cellulaires visant à assurer l'intégrité du génome. L'ARNdb induit chez les plantes une méthylation de gènes au niveau des régions ayant une homologie de séquence, cette méthylation ayant un rôle dans la régulation de l'expression du génome. Des études ont également montré qu'il existait une relation entre le système d'ARN interférence et la formation de l'hétérochromatine (130, 135). Les siRNA sont impliqués dans la dynamique chromosomique lors de la méiose et de la mitose, contribuant ainsi à la stabilité du génome. En effet, chez des mutants pour les gènes impliqués dans l'ARN interférence, on observe que les chromosomes se ségrégent de manière aberrante (56).

En 1993, il fut montré chez le ver *C.Elegans* l'existence de gènes codant pour de petits ARN exerçant un effet régulateur négatif spécifique de gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement de la larve (2). La régulation induite par ces petits ARN s'effectue au niveau traductionnel. Par la suite, de nombreux ARN de 21-22 nucléotides furent identifiés, y compris dans les cellules dans lesquelles aucun ARNdb externe n'avait été introduit. On appela microRNA (miRNA) l'ensemble de ces petits ARN. Ces miRNA ont par la suite été identifiés chez les invertébrés et les vertébrés et sont hautement conservés. Il est apparu qu'ils avaient une fonction biologique importante. Ces miRNA sont produits à partir d'un transcrit primaire qui est mûri par l'enzyme Drosha pour former un ARN ayant une forme d'épingle à cheveux appelé shRNA (short hairpin RNA), puis en miRNA par Dicer (145). Ils se lient également au niveau des ARN messagers mais de façon imparfaite, ce qui entraîne une inhibition de la traduction et non une dégradation de l'ARNm comme les siRNA (figure 9). Ce système semble très développé chez les mammifères et il se pourrait que cette voie ait été préservée de façon sélective, supplantant le système des siRNA, celui-ci n'étant pas nécessaire chez les mammifères du fait de l'existence du système interféron. Les fonctions des miRNA identifiés chez les mammifères sont inconnues pour la plupart. Récemment, en plus des plantes, insectes,

invertébrés et mammifères, Pfeffer *et al* ont identifié des miRNA d'origine virale dans des cellules infectées par l'EBV (100). Des miRNA produits par d'autres herpesvirus ont également été découverts (53). Ces miRNA, capables de réguler l'expression des gènes viraux mais aussi de moduler l'expression des gènes cellulaires, seraient un outil pour favoriser l'infection virale.

La découverte des siRNA a donc conduit à la découverte d'une autre classe de petits ARN, les miRNA, mettant en évidence deux formes d'interférence par l'ARN qui participent toutes deux au maintien de l'intégrité cellulaire.



**Figure 9 : comparaison des mécanismes d'action des siRNAs et des miRNA.**

Le siRNA généré par l'enzyme Dicer se lie par l'intermédiaire du complexe RISC, sur une région codante d'un ARN messager. La parfaite complémentarité de séquence entre le siRNA et l'ARNm provoque la dégradation de ce dernier (*à gauche*).

Le miRNA résulte de l'action des deux enzymes Drosha et Dicer. Il est reconnu par un complexe qui ressemble au complexe RISC. Celui-ci provoque la liaison du miRNA au niveau des régions 3' non codantes d'un ARNm. La liaison imparfaite du miRNA au niveau du messager provoque une inhibition post transcriptionnelle et empêche la synthèse de la protéine correspondante (*à droite*). (129).

## 4 ARN interférence et virus

L'ARN interférence a déjà été utilisé pour tenter d'inhiber la réplication de nombreux virus, tout d'abord *in vitro* en culture cellulaire puis *in vivo* chez l'animal. Ces essais ont concerné aussi bien des virus à ARN que des virus à ADN. La stratégie d'ARN interférence peut être utilisée pour cibler les différentes phases du cycle viral, que ce soit au niveau de la pénétration du virus dans la cellule, de la réplication, de la transcription, de l'assemblage de nouveaux virions ou du relargage du virus dans le milieu extérieur. Lorsqu'il s'agit de virus à ARN, les siRNA peuvent agir soit directement sur les constituants du virus soit sur les ARN messagers (ARNm) résultant de la transcription virale. Dans le cas des virus à ADN, les siRNA ne peuvent agir que lorsque le virus a pénétré dans la cellule et que son génome a été transcrit, limitant l'action des ARN interférents à la destruction de l'ARNm.

### 4.1 siRNA et virus à ARN

De nombreuses études rapportant des essais d'ARN interférence sur des virus à ARN ont été publiées: les picornavirus, le virus de l'hépatite C, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'influenza virus ou le virus associé au syndrome respiratoire aigu sévère (CoV-SARS) ont été ciblés par des siRNA. Le tableau IV ci-dessous présente quelques exemples de ces études. Ces études, qui ne seront pas détaillées ici, ont montré qu'il était possible d'utiliser les ARN interférents pour cibler des protéines structurales (protéine M du CoV-SARS, nucléocapside de l'influenza virus), des protéines enzymatiques (intégrase du VIH) ou encore des régions non traduites du génome (nontranslated regions (NTR) des virus de l'hépatite A et de l'hépatite C). Ces ARN interférents ont été délivrés le plus souvent par transfection, soit sous la forme de courts duplex d'ARN, soit sous forme de short hairpin RNA (shRNA), système permettant d'obtenir un effet prolongé. Quelques études dans lesquelles les siRNA ont été délivrés au niveau de la muqueuse nasale ont été menées *in vivo* contre des virus respiratoires. Ces différents travaux ont montré que les ARN interférents pouvaient être utilisés avec succès *in vitro* et *in vivo* pour inhiber la réplication des virus à ARN.

**Tableau IV : ARN interférence et virus à ARN**

Virus	Système d'expression	Mode de délivrance	Modèle (cellule ou animal)	Cible	Effet principal	Référence
Virus de l'hépatite A	siRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules HuH7	Différentes régions codants pour des protéines non structurales	Diminution réplication, baisse de l'infectiosité	(75)
	shRNA	Transfection (effectene)	Cellules HuH7	IRES (internal ribosome entry site) dans la région 5' non codante (5 sites)	Inhibition de la traduction et de la réplication virale	(67)
Virus de l'hépatite C	shRNA	Electroporation	Cellules HuH7	2 sites région NTR 1 site région codante Core	Inhibition traduction et réplication	(66)
	siRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules HuH7	Région NTR, 2 cofacteurs cellulaires (PSMA7, HuR)	Diminution ARN viral et protéine NS5B	(73)
	shRNA/esiRNA (endoribonuclease-prepared siRNA)	Electroporation	Cellules HuH7	Région NTR ou Core	Inhibition de la réplication virale	(74)
CoV-SARS	siRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules HEK 293T	Protéine M	Diminution de la réplication	(103)
	shRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules Véro	ARN polymérase	Diminution de la réplication virale et de l'effet cytopathique	(134)
	siRNA	Intranasal chez le singe	<i>In vivo</i> (singe)	Protéine Spike, complexe réplicase/transcriptase	Diminution réplication virale et symptomatologie	(79)
VIH	shRNA	Transfection (FuGENE 6)	Cellules 293T	Intégrase	Diminution de la réplication virale	(76)
	esiRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules U87-CD4	Rétro-transcriptase	Diminution de la réplication virale	(50)
Rhinovirus humain de type 16	siRNA	Transfection (oligofectamine)	Cellules HeLa	Protéine structurale de capsid VP4, région non codante A et C	Inhibition de la réplication virale	(102)
Virus de l'hépatite delta	siRNA	Transfection (lipofectamine)	Cellules HuH7	16 siRNA testés, cible non précisée	Inhibition de la réplication virale	(15)
Influenza virus	siRNA/shRNA (vecteur de type lentivirus)	Intranasal (PEI)	<i>In vivo</i> (souris)	Nucléocapsid (NP), PA et PB1 (composants de la transcriptase)	Prévention et traitement de l'infection	(44)
	siRNA	Intranasal (Oligofectamine)	<i>In vivo</i> (souris)	Polymérase acide (PA) et NP	Diminution de la réplication	(124)

## 4.2 siRNA et virus à ADN

Dans le cas des virus à ADN, l'inhibition due au phénomène d'ARN interférence résulte de la perte de certaines fonctions virales liées à la dégradation de l'ARN messager. L'utilisation des siRNA dans le contexte d'infections virales par des virus à ADN est actuellement à l'étude. Avant de développer les études d'ARN interférence concernant le virus d'Epstein-Barr, deux autres virus à ADN seront pris en exemple, le virus de l'hépatite B (VHB) et les papillomavirus. Comme l'EBV, ces deux virus sont en effet associés au développement de certaines pathologies cancéreuses, l'hépatocarcinome dans le premier cas et le cancer du col utérin dans le deuxième cas. Les études d'ARN interférence publiées pour ces deux virus montrent qu'il est possible d'inhiber la réplication virale ou la production de protéines oncogènes grâce aux siRNA et d'obtenir une activité anticancéreuse.

### *a Virus de l'hépatite B*

Le virus de l'hépatite B (VHB), de la famille des *Hepadnaviridae*, est un virus à ADN circulaire, bicaténaire sur  $\frac{3}{4}$  de sa circonférence. Le cycle de réplication est complexe et comprend une phase de transcription inverse avec synthèse d'un ARN pré-génomique. Le VHB peut donc être sensible à l'ARN interférence à la fois au niveau post-transcriptionnel (dégradation de l'ARNm) mais aussi au niveau pré-génomique. Les protéines virales sont codées dans des cadres de lecture partiellement chevauchants. Le gène S code pour l'antigène HBs (subdivisé en préS1, S2 et S), le gène C pour l'antigène HBc (subdivisé en PréC et C) et pour l'antigène HBe, le gène P pour l'ADN polymérase virale et le gène X pour une protéine transactivatrice qui serait impliquée dans la formation de l'hépatocarcinome. Le VHB est responsable d'infections hépatiques qui deviennent chroniques chez 5% à 10% des sujets adultes. De nombreux facteurs déterminent l'évolution de l'hépatite chronique, et près de 25% des patients atteints d'infection chronique développent un carcinome hépatocellulaire. Les mécanismes de cette oncogénèse ne sont pas encore complètement élucidés, la réorganisation du tissu hépatique liée à la fibrose ainsi qu'un effet direct du virus étant incriminés. Des études d'ARN interférence ont été conduites dans le but de diminuer la réplication virale du VHB. Plusieurs régions du génome du VHB ont été ciblées : en premier lieu la région codant

pour l'antigène HBs mais aussi les régions codant pour les protéines du core et pour la protéine X. De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées sur des cellules humaines d'hépatocarcinomes : les cellules Huh7 transfectées avec un plasmide contenant le génome viral du VHB (17, 86, 127) et la lignée HepG2.2.15, qui exprime le génome du VHB de façon constitutive (91, 105, 140, 143). Ces études ont montré que la réplication du génome de l'hépatite B pouvait être inhibée efficacement par des siRNA en culture cellulaire. Des études sur des modèles *in vivo* ont par la suite été réalisées : ces modèles correspondent à des souris chez lesquelles la réplication du virus est induite par injection hydrodynamique d'un plasmide contenant le génome viral ainsi qu'à des souris transgéniques exprimant de façon constitutive l'antigène HBs dans le foie. Le tableau V présente quelques exemples de ces études. Plusieurs modes de délivrance ont été utilisés : des vecteurs de type plasmidique (19, 86, 143), des vecteurs de type adénovirus (17, 127), des siRNA encapsulés dans une particule de type liposome (91). Chez la souris, Giladi *et al* ont montré que la coinjection d'un plasmide contenant le génome du VHB et d'un plasmide contenant un siRNA dirigé contre l'antigène HBs entraînait une diminution des taux d'antigènes HBs et HBe. L'ADN viral était indétectable dans le sérum des souris traités 3 jours après l'injection (49). McCaffrey *et al* ont testé l'efficacité anti-VHB de 6 cassettes d'expression permettant la délivrance de shRNA. L'évaluation de l'inhibition de la réplication du VHB s'est faite par la mesure quantitative des antigènes HBs et HBe. La séquence la plus efficace a permis de réduire la sécrétion de l'antigène HBs de 84% en culture cellulaire et de 85% *in vivo* (86). Cheng *et al* ont testé 10 siRNA différents et montré que les niveaux d'ARN viraux pouvaient être réduits de 90%, et que l'ADN viral était indétectable suite à l'administration des siRNA (19). Uprichard *et al* ont utilisé un vecteur de type adénovirus permettant la délivrance de shRNA, réduisant les niveaux d'antigènes HBs et HBe dans le sérum des souris infectées. Ils ont également montré que cet effet ne résultait pas de l'induction de la voie de l'interféron et était durable dans le temps (127). Quelques études se sont intéressées plus particulièrement à la protéine codée par le gène HBx, une protéine de 17 kDa impliquée dans la formation de l'hépatocarcinome. Shin *et al* ont sélectionné 2 siRNA parmi 5 ciblant la protéine X et montré que de faibles doses de ces siRNA permettait de diminuer l'expression de la protéine et la réplication du virus *in vitro* et *in vivo*, faisant de cette stratégie un outil thérapeutique potentiel pour traiter les hépatites chroniques et les hépatocarcinomes associés au VHB (116). Des vecteurs permettant l'expression de shRNA ciblant HBx ont également montré une diminution de la croissance cellulaire, un ralentissement du

développement tumoral, et une réduction de l'expression des antigènes C-myc et Bcl-X(L), confortant le rôle de la protéine X dans les phénomènes de cancérisation (14).

Ces différents résultats mettent en évidence l'intérêt de la stratégie d'ARN interférence pour inhiber la réplication virale du VHB et pour empêcher le développement des phénomènes tumoraux associés à ce virus.

**Tableau V : études d'ARN interférence *in vivo* contre le virus de l'hépatite B**

Référence	shRNA/siRNA (formulation)	Cible	Principal effet
Giladi <i>et al</i> 2003	siRNA (plasmide)	S	Diminution Ag HBs, Ag Hbe, ADN
McCaffrey <i>et al</i> 2003	shRNA (plasmide)	C, pré-S et X	Diminution Ag HBs, Ag HBc
Chen <i>et al</i> 2007	shRNA (adenovirus)	préC, C, S	Diminution Ag HBs, Ag HBe, ADN, ARN
Uprichard <i>et al</i> 2004l	shRNA (adenovirus)	Core, X, S	Diminution Ag HBs, Ag HBe, ADN, ARN
Morrissey <i>et al</i> 2005l	siRNA (liposome)	Position 263 et 1583 du génome du VHB	Diminution Ag HBs, ADN
Ying <i>et al</i> 2006l	shRNA (plasmide)	Core, S	Diminution Ag HBs, Ag Hbe, Ag HBc
Shin <i>et al</i> 2006l	siRNA (plasmide)	X	Diminution Ag HBs, ARN
Cheng <i>et al</i> 2005	shRNA (plasmide)	S	Diminution Ag HBs, Ag HBc, ADN, ARN

### ***b Papillomavirus***

Les papillomavirus sont de petits virus à ADN. Les types 16 et 18 sont associés aux cancers du col de l'utérus. L'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire est une étape importante de la transformation cellulaire, permettant l'expression de deux protéines E6 et E7, qui inactivent des protéines anti-oncogènes. Les protéines E6 et E7 sont exprimées par épissage alternatif à partir d'un seul ARNm bicistronique. La protéine E6 induit la dégradation de p53 par liaison avec une ligase et formation d'un complexe ternaire. La protéine p53 étant essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire, son inactivation entraîne une dérégulation du cycle cellulaire et favorise la prolifération cellulaire. La protéine E7 inactive pRb. Cette protéine régule le cycle cellulaire en séquestrant sous une forme hypophosphorylée le facteur de transcription E2F essentiel à l'activation transcriptionnelle

de gènes impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire. E7 se lie à la forme hypophosphorylée de pRb ce qui libère E2F et induit une dérégulation du cycle cellulaire. Les deux protéines E6 et E7 sont actuellement ciblées par ARN interférence dans le but d'obtenir un effet anticancéreux. Une réduction de l'expression des protéines E6 et E7 a été mise en évidence dans des cellules HeLa (cellules transformées avec HPV18), entraînant la sénescence de ces cellules (55). D'autres études *in vitro* ont montré une diminution de la prolifération cellulaire, de la capacité d'invasion dans des cellules SiHa (4), une induction de la mort cellulaire (141) et une inhibition de la croissance cellulaire (77). Des essais *in vivo* ont également été réalisés. Le développement d'une masse tumorale a été induit chez des souris par inoculation dans le dos à l'aide d'une aiguille de cellules SKG-II, cellules dérivées d'un cancer cervical humain. L'injection au sein de cette masse ou dans la cavité péritonéale des souris de siRNA ciblant E6 et E7 et complexés à l'atellocollagène a entraîné une diminution de la masse tumorale indiquant une diminution de la prolifération cellulaire (42). Dans un autre modèle *in vivo*, des cellules CaSki (cellules également obtenues à partir d'un cancer cervical humain) ont été injectées dans le tissu sous-cutané des souris au niveau d'un membre puis des siRNA ciblant E6 ont été injectés dans la tumeur ou dans la cavité péritonéale, ce qui s'est traduit par une inhibition de la croissance tumorale, une diminution de l'expression de la protéine E6 et une augmentation de l'apoptose (97). Dans une autre étude, des shRNA ciblant E6 délivrés par l'intermédiaire d'un vecteur de type lentivirus ont induit la sénescence des cellules après utilisation à faible dose et l'apoptose après utilisation à forte dose *in vivo* (54). Cet effet sur l'apoptose n'a pas été retrouvé dans tous les cas : l'utilisation d'un siRNA ciblant l'ARNm des protéines E6 et E7 a entraîné une diminution de l'expression de ces deux protéines et une augmentation de l'expression de la protéine p53 dans des cellules dérivées d'un cancer cervical mais sans signe d'apoptose cellulaire. Les auteurs ont également observé une suppression de l'action du siRNA dans le temps avec réapparition de la protéine E7, traduisant un phénomène de désensibilisation des cellules (122).

L'inhibition de deux protéines oncogènes par des ARN interférents pourrait donc être un nouveau moyen pour empêcher les phénomènes de cancérisation liés aux papillomavirus.

### c *Virus d'Epstein Barr*

Concernant notre virus d'intérêt, il existe peu de travaux relatant l'utilisation de siRNA pour étudier ou inhiber le virus d'Epstein-Barr. Les siRNA peuvent être utilisés pour inhiber le cycle lytique du virus et ainsi la réplication virale ou pour inhiber le cycle de latence et la transformation cellulaire. Plusieurs groupes ont obtenu une activité antivirale et anticancéreuse grâce à des siRNA dans des lignées cellulaires infectées par l'EBV. La plupart des travaux ont concerné des protéines impliquées dans les phénomènes de transformation cellulaire associés à l'EBV, une étude s'est intéressée à la protéine transactivatrice Zebra et deux études ont utilisé l'ARN interférence comme outil pour préciser la fonction de certaines protéines.

➤ Concernant les travaux de génomique fonctionnelle, Gao *et al* ont montré que le cycle lytique de l'EBV peut être induit par du 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) dans des cellules épithéliales EBV positives GT38 issues de tissu gastrique humain, et que ce mécanisme passait par la phosphorylation de p38 (protéine kinase cellulaire activée sous l'action de mitogènes) et par l'augmentation du nombre d'ARN messagers (ARNm) de *c-myc*. Ils ont observé une augmentation des ARNm d'un gène viral très précoce BZLF1 et de sa protéine Zebra. Grâce à l'utilisation de siRNA anti-p38 et anti-*c-myc*, l'expression de Zebra et des protéines précoces a été supprimée ce qui a confirmé le rôle de ces deux protéines cellulaires dans l'induction du cycle lytique de l'EBV par le TPA (43). Plus récemment, l'utilisation de siRNA dirigés contre la protéine kinase codée par le gène BGLF4 de l'EBV a permis de préciser la fonction de cette protéine qui interviendrait dans l'export des composants viraux du noyau vers le cytoplasme. Si la mise en évidence d'un effet antiviral ou anticancéreux n'était pas le principal objectif de cette étude, elle a cependant montré que l'expression de cette protéine était cruciale pour la production de particules infectieuses puisque les siRNA ont entraîné une réduction de l'infectiosité du virus, une diminution de la synthèse d'ADN viral et une diminution de la synthèse des protéines virales (48).

➤ Une équipe taïwanaise a utilisé des siRNA contre le gène du transactivateur Zebra afin de bloquer la réactivation de l'EBV dans des cellules épithéliales 293A contenant le génome de l'EBV et des cellules issues de carcinome du nasopharynx (NPC). A l'aide d'un vecteur plasmidique permettant l'expression stable des siRNA anti-Zebra, ils ont

montré une inhibition efficace de la production de Zebra induisant ainsi une absence de réactivation de l'EBV, spontanée ou induite par du TPA (16). L'utilisation de ces siRNA anti-Zebra pourrait ainsi empêcher l'induction du cycle lytique en bloquant la phase initiale de la réactivation, contrairement à l'aciclovir qui n'affecte pas la protéine Zebra.

➤ Les autres études ont concerné des protéines du cycle de latence du virus, la protéine LMP1 impliquée dans la transformation cellulaire et la protéine EBNA1 responsable du maintien du génome viral sous forme épisomale. Ces deux protéines sont impliquées dans les phénomènes de cancérisation liés à l'EBV.

Deux équipes chinoises, ont choisi de cibler la protéine virale LMP1 afin d'investiguer l'effet de cette protéine sur la prolifération cellulaire. Après transfection d'un plasmide codant pour les siRNA dans des cellules C666 de carcinome du nasopharynx, Li *et al* ont montré une diminution de la mobilité cellulaire, de l'adhésivité des cellules ainsi que de leur capacité d'invasion transmembranaire, mais peu d'effet sur le taux de croissance et le cycle cellulaire (83). Mei *et al*, en transfectant des siRNA dans des cellules lymphoblastoïdes B95-8, ont montré une diminution très importante des ARNm de LMP1 ainsi qu'une baisse de la production de la protéine (88). Ils ont observé dans les cellules ainsi traitées une absence totale de prolifération voire même une apoptose et ceci en parallèle d'une diminution de l'activité de la télomérase cellulaire. Les auteurs de ces deux études concluent que l'inhibition de LMP1 par les siRNA pourrait être utilisée en thérapeutique afin de prévenir et de traiter les lymphoproliférations et les carcinomes du nasopharynx associés à EBV. Ces deux équipes ont complété leurs travaux sur LMP1 récemment. L'équipe de Li a montré qu'il était possible de ralentir la formation des métastases dans un modèle *in vivo* grâce à l'utilisation d'un vecteur adénovirus produisant des shRNA dirigés contre la protéine LMP1. Les souris utilisées ont reçu directement dans le foie par laparotomie une injection de cellules C666-1 infectées par le vecteur adénovirus. Les métastases au niveau des poumons et dans les autres parties du foie ont été moins fréquentes chez les souris traitées, sans amélioration de la survie cependant. Ils ont également montré que les propriétés transformantes de LMP1 étaient associées à l'induction de l'expression du gène de la protéine MMP-9 (métalloprotéinase-9) par LMP1 (82). L'équipe de Mei, toujours sur des cellules C666-1, a confirmé *in vitro* que l'utilisation de siRNA dirigés contre LMP1 permettait de ralentir la croissance cellulaire et d'augmenter la sensibilité des cellules aux anticancéreux tels que la blémomycine et le

cisplatine par le biais de la voie des kinases (inhibition de la protéine kinase B par les siRNA LMP1).

Enfin, deux équipes ont inhibé par ARN interférence un antigène nucléaire associé à la latence d'EBV : EBNA1. En effet, cette protéine apparaît comme fondamentale pour maintenir l'épisome viral et semble jouer un rôle important dans les phénomènes tumoraux dus à l'EBV. Dans la première étude, les siRNA anti-EBNA1 ont été produits sous forme de shRNA par un vecteur plasmidique. La transfection de ce plasmide dans des cellules Raji a entraîné une diminution de l'ARNm d'EBNA1, une inhibition de la prolifération des cellules Raji associée à une régulation négative de l'oncogène EBNA2, une diminution de l'index PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et une augmentation de la fraction de cellules en phase G0/G1 (62). Dans la deuxième étude, les siRNA anti-EBNA1 ont permis d'obtenir une inhibition spécifique de l'expression de EBNA1 et une perte du maintien de l'épisome. Ces siRNA ont également induit une inhibition de la prolifération cellulaire de cellules NPC-KT. Ces cellules sont des cellules épithéliales issues de la fusion de cellules de carcinome nasopharyngé avec des cellules déficientes en hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase chez lesquelles on observe une persistance à long terme de l'EBV en culture, ce qui suggère que l'EBV doit être requis pour la survie de ces cellules (142). Les auteurs de ces deux études concluent que les siRNA anti-EBNA1 pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans les maladies associées à l'EBV.

Ces différents travaux suggèrent que l'ARN interférence pourrait être utilisée dans le traitement de certains cancers associés à l'EBV.

Ces nombreuses études suggèrent qu'il est possible de mettre en œuvre la stratégie de l'ARN interférence en thérapeutique dans le domaine des maladies infectieuses virales notamment. Cette stratégie pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans la lutte contre les infections virales, aussi bien pour les virus à ARN que pour les virus à ADN. Le champ d'application de cette stratégie pourrait ainsi s'étendre au traitement des cancers viro-induits.

**Tableau VI: ARN interférence et virus d'Epstein Barr**

Référence	Modèle cellulaire	siRNA/shRNA	Mode de délivrance	Protéine ciblée	Effet
Gao et al (2004) (43)	GT38 (in vitro)	siRNA	Transfection, lipofectamine 2000	p38 et c-myc	-Blocage de la réactivation de l'EBV induite par le TPA -précise le rôle de p38 et c-myc
Chang et al (2004) (16)	NPC-TW01 (in vitro) 293A	shRNA (pSUPERplasmid)	Transfection, lipofectamine 2000	zébra	-Prévient la réactivation induite par des agents chimiques -supprime l'activation constitutive dans des cellules nouvellement infectées
Hong et al (2006) (62)	Raji (in vitro) B95-8	shRNA (pSIREN-RetroQ)	Transfection, nucleofactor	EBNA1	-Supprime l'expression d'EBNA1 dans les cellules Raji -diminution de la croissance cellulaire -augmentation de la fréquence des cellules en phase G0-G1
Yin et al (2006) (142)	NPC-KT (in vitro)	siRNA, shRNA (pSUPERretro)	Transfection (siRNA) Electroporation shRNA	EBNA1	-inhibition de l'expression d'EBNA1 -inhibition de la croissance tumorale
Mei et al (2006) (88)	B95-8 (in vitro) CNE2	shRNA (pSilencerhygro)	Transfection lipofectamine	LMP1	-diminution de l'expression de LMP1 -augmentation de l'apoptose -augmentation de la fraction de cellule en phase
Li et al (2004) (83)	C666-1 (in vitro)	shRNA (pAVU6+27)	Transfection oligofectamine	LMP1	-Altération de la mobilité cellulaire et des capacités d'invasion -Peu d'effet sur le taux de croissance et le cycle cellulaire
Li et al (2006) (82)	C666-1 (in vitro, NPC nude mouse model)	shRNA (adénovirus rAAV-2)	Infection	LMP1	-inhibition de l'expression de LMP1 -diminution de la taille des métastases in vivo mais pas d'incidence sur la survie
Gershburg et al (2007) (48)	293 EBV-GFP	siRNA	Transfection (lipofectamine)	Protéine kinase	-diminution de l'infectiosité, de l'ADN viral -empêche l'export des particules infectieuses du noyau vers le cytoplasme
Mei et al (2006) (88)	C666-1 (in vitro)	shRNA (pSilencerhygro)	Transfection lipofectamine	LMP1	-ralentit la croissance cellulaire -augmente la sensibilité des cellules à la bléomycine et au cisplatine

## **TRAVAIL EXPERIMENTAL**

---

# I Objectifs du travail

---

Les traitements conventionnels des cancers associés à l'EBV (chimiothérapie, radiothérapie et administration d'anticorps monoclonaux anti-lymphocytes B) ne permettent pas toujours une rémission complète et sont pour la plupart lourds et coûteux.

Le cycle de latence du virus est le principal responsable de l'apparition de ces cancers mais certaines études ont montré que le cycle lytique du virus pourrait également jouer un rôle. Les molécules antiherpétiques ont de ce fait été utilisées pour traiter ces maladies, sans grand succès. Les inhibiteurs de l'ADN polymérase virale ont en effet une faible efficacité sur l'ADN polymérase de l'EBV. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour inhiber le cycle lytique de l'EBV.

Les protéases virales interviennent dans le cycle de multiplication de nombreux virus et la caractérisation de leur structure tridimensionnelle a permis de développer des médicaments efficaces *in vivo* contre le virus de l'immunodéficience acquise, le virus de l'hépatite C et le coronaravirus responsable du SARS. La protéase de l'EBV est indispensable à la formation d'une capsidie virale mature et à l'incorporation de l'ADN viral dans cette capsidie. L'inhibition de cette protéine du cycle lytique pourrait donc être une nouvelle voie thérapeutique intéressante.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'inhiber cette protéase par ARN interférence. L'ARN interférence est un processus cellulaire qui permet l'inhibition de l'expression d'un gène au niveau post-transcriptionnel, par dégradation de l'ARN messager du gène correspondant.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle de cellules épithéliales capables d'exprimer le cycle lytique complet du virus marqué par la Green Fluorescent Protein.

La première partie de l'étude a concerné la caractérisation de l'expression de la protéase et la mise au point de la délivrance des siRNA dans ce système cellulaire.

Dans la deuxième partie de l'étude, l'activité des siRNA anti-protéase sur l'expression et la réplication du virus a été évaluée.

## II Matériel et méthodes

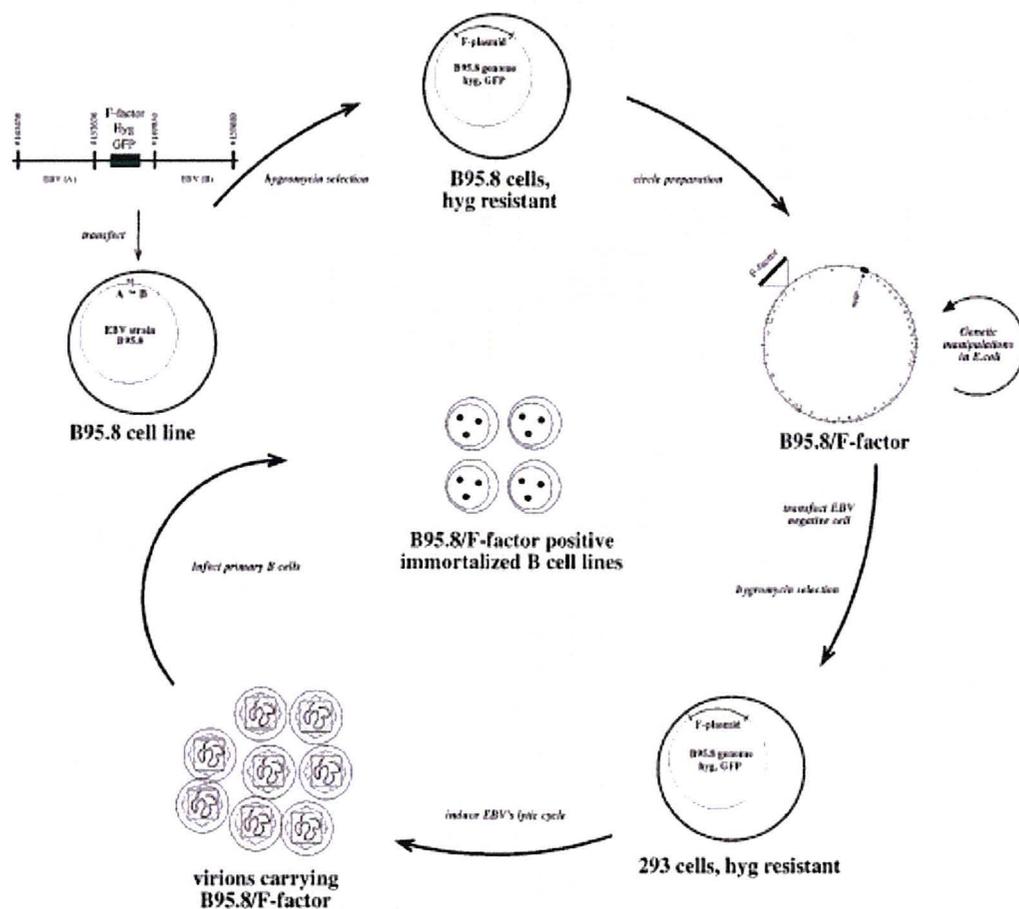
---

### 1 lignées cellulaires et virus

#### 1.1 Les cellules 293 EBV-GFP

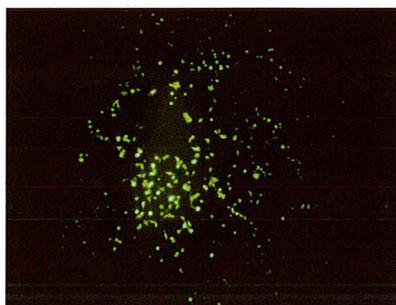
Le système cellulaire utilisé, décrit par Delecluse, nous a été gracieusement fourni par le Professeur Hamerschmidt. Il s'agit d'une lignée de cellules épithéliales humaines HEK 293 transfectée stablement par un bacmide codant pour le génome complet de la souche EBV B95-8, modifiée pour exprimer la Green Fluorescent Protein (GFP) (28).

Ces cellules ont été construites de la façon suivante : le plasmide p1919 linéarisé (plasmide comprenant un facteur F de réplication, un gène de résistance à l'hygromycine, la GFP et les zones A et B encadrant le génome de l'EBV) a été transfecté dans des cellules B95-8, cellules qui sont infectées de manière latente par l'EBV. Les cellules ayant correctement intégré le plasmide p1919 par recombinaison homologue ont été sélectionnées par l'hygromycine. L'ADN de ces cellules a été extrait par des méthodes de dénaturation-renaturation puis transfecté dans la souche DH10B d'*Escherichia coli* (*E.coli*) par électroporation. Ceci a permis d'amplifier en grande quantité, chez *E.Coli*, le génome modifié du virus B95-8 (génome comprenant désormais le facteur F, le gène de résistance à l'hygromycine et la GFP). Le plasmide B95-8/facteurF/GFP a été transfecté dans une lignée de cellules EBV négatives, la lignée de cellules épithéliales 293. Une nouvelle sélection par l'hygromycine a eu lieu afin de récupérer les cellules ayant intégré sous forme épisomale le génome de l'EBV couplé à la GFP. L'induction du cycle lytique du virus dans les cellules 293 permet d'obtenir des virions portant le plasmide B95-8/facteur F/GFP (figure 10).



**Figure 10 : conception des cellules 293 EBV-GFP**

Les cellules que nous utilisons sont donc fluorescentes et contiennent l'EBV sous une forme épisomale (forme latente) (figure 11). Il est possible d'induire le cycle lytique de l'EBV et la production de virions-GFP en délivrant à l'intérieur de la cellule, par transfection, un plasmide codant pour le transactivateur principal du virus, la protéine Zebra (gène BZLF1). La cotransfection d'un second plasmide codant pour la glycoprotéine de surface gp110 (gène BALF4) permet d'augmenter l'infectiosité des virions produits, par un mécanisme encore non élucidé. Ces deux plasmides seront appelés plasmides inducteurs.



**Figure 11 : fluorescence des cellules 293 EBV-GFP**

Dans certaines expériences, un plasmide vide nommé pcDNA, plasmide servant de contrôle négatif de l'induction, a été transfecté à la place des plasmides inducteurs.

### **1.2 Les cellules Raji**

Les cellules Raji utilisées pour les tests d'infectiosité sont des cellules EBV positives issues d'un lymphome de Burkitt. Elles contiennent un nombre limité de copies du génome de l'EBV. Leur utilisation sera décrite plus loin.

### **1.3 Culture cellulaire**

Les deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu RPMI complété de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Le RPMI est additionné de L-glutamine (1%), de pénicilline et streptomycine (10000 U pour la pénicilline et 10000 µg/mL pour la streptomycine).

## 2 Synthèse des siRNA

La synthèse des siRNA peut se faire selon plusieurs méthodes : synthèse chimique, transcription *in vitro*, digestion *in vitro* d'un long ARNdb, expression *via* un plasmide ou un vecteur viral, expression *via* un produit de PCR (cassette d'expression). La synthèse chimique est la méthode de préparation des siRNA la plus utilisée pour des expériences transitoires en culture cellulaire, car les siRNA sont plus faciles à transfecter que les plasmides. Un des autres avantages de cette méthode est son rendement élevé de siRNA purifiés. Ses inconvénients incluent un coût élevé et un temps de réalisation assez long (4 à 12 jours). Nous avons opté pour cette méthode de synthèse et celle-ci a été confiée à la société Qiagen, qui figure parmi les sociétés spécialisées dans le « design » et la synthèse des siRNA. En effet, des règles ont été définies par l'équipe de Tuschl (31) puis certaines compagnies ont développé des algorithmes permettant d'augmenter encore l'efficacité des siRNA par rapport aux méthodes traditionnelles décrites (13). Parmi les critères à respecter, on peut citer :

- La taille du siRNA doit être d'environ 20 nucléotides
- Le siRNA doit posséder un débordement UU en 3', que ce soit sur le brin sens ou anti-sens
- Le contenu en G/C doit être d'environ 50%. Il semble en effet que les siRNA avec 30 à 50% de contenu en GC soient plus actifs que ceux avec un contenu plus élevé en résidu GC. Un faible contenu en GC est donc corrélé avec une augmentation de l'efficacité du « silencing ». Il semblerait aussi que les siRNA contenant un fort taux de résidus GC au niveau de l'extrémité 3' du brin anti-sens, et un faible taux du côté 5' soient plus efficaces.
- Le rôle de la position de la séquence cible dans la région codante
- Eviter les séquences cibles qui présentent 16-17 paires de bases contiguës similaires à d'autres séquences codantes. En effet, des études ont permis de voir qu'on pouvait assister à un « silencing » de gènes non-ciblés contenant seulement 11 nucléotides contigus identiques au siRNA. Les siRNA ne peuvent donc être utilisés que pour des cibles ne présentant pas de trop fortes similarités avec d'autres gènes. L'outil BLAST (basic local alignment search tool), qui permet des comparaisons de séquences, permet d'éliminer les séquences cibles qui présentent un trop fort taux de similarité avec d'autres gènes.

Ces critères ont évolué depuis les premières expériences, l'équipe de Reynolds a proposé un modèle prenant en compte 10 critères. Parmi ces critères figurent le pourcentage en GC, mais aussi une faible stabilité du siRNA en 5' du brin antisens, une absence de répétition interne, un A en position 19 ou un U en position 10 (107).

Nous avons utilisé deux types de siRNA : des siRNA dirigés contre la protéase et des siRNA contrôle.

- **siRNA « protéase »**

Quatre siRNA dirigés contre la protéase de l'EBV ont donc été dessinés selon les règles d'Elbashir à partir de la séquence publiée du génome complet de l'EBV (NCBI genebank, NC 001345) (figure 12). Les séquences cibles choisies ont été soumises à un BLAST pour s'assurer qu'elles sont retrouvées uniquement dans le génome de l'EBV.

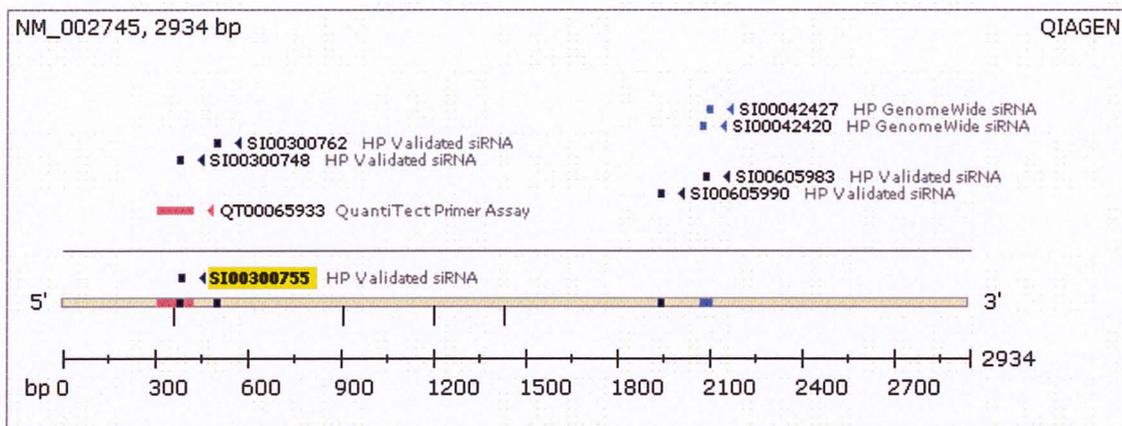
Les 4 siRNA protéase ont été utilisés dans un mélange équimolaire. Par la suite, ce mélange sera appelé pool de siPR. Le siRNA numéro 1 sera appelé siPR1.



**Figure 12 : représentation schématique des siRNA utilisés et leur position au sein du génome de l'EBV.** En gras figure la séquence des amorces utilisées pour la RT-PCR protéase, en encadré figure la séquence de la sonde de cette même PCR. Dans l'ordre d'apparition : siPR4, siPR1, siPR2 et siPR3 (gris).

- **siRNA contrôle**

Nous avons utilisé un siRNA dirigé contre l'expression du gène codant pour la kinase cellulaire MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1) (Qiagen) (figure 13), un siRNA NT (siRNA non targeting) ne ciblant aucun ARNm (Dharmacon), et un siRNA utilisé comme marqueur d'efficacité de la transfection, le siGLO RISC-Free siRNA (Dharmacon). Ce siRNA ne cible aucune séquence spécifique et est marqué par un fluorophore sur son brin sens, ce qui permet une visualisation directe de ce siRNA par microscopie de fluorescence.



**Figure 13 : position du siRNA MAPK1 utilisé au sein du gène de MAPK1.** En rouge figure la position des amorces utilisées pour la RT-PCR, en encadré jaune figure le siRNA MAPK1 qui a été choisi, pour sa position commune avec celle des amorces.

### 3 Transfection

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules 293 EBV-GFP sontensemencées en plaque de culture de 24 puits à raison de  $10^5$  cellules par puits dans 500  $\mu$ L afin d'obtenir le jour de la transfection une confluence cellulaire d'environ 60-70% (figure 14).

Les siRNA et/ou les plasmides inducteurs sont dilués dans le milieu OPTI-MEM (Invitrogen) puis incubés avec le réactif de transfection : Lipofectamine 2000 (Invitrogen, France), JetSi (Polyplus transfection, France) ou HighPerfect (Qiagen, France) pendant 20 minutes à température ambiante afin d'obtenir les complexes siRNA +/- plasmide/réactif transfectant. Immédiatement avant la transfection, 100  $\mu$ L de milieu sont enlevés de chaque puits et remplacés par 100  $\mu$ L de milieu frais préalablement chauffé, puis 100  $\mu$ L de complexe sont ajoutés. La plaque de culture est ensuite centrifugée pendant 30 minutes à 800 tours/min puis mise à l'étuve à 37°C pendant 5 heures. Cette centrifugation permet d'augmenter l'efficacité de la transfection. Le milieu est ensuite changé (pour éliminer le réactif de transfection) et la plaque est remise à l'étuve. Les culots cellulaires et les surnageants sont récupérés 72h après la transfection pour l'analyse (utilisation immédiate ou congélation à -80°C).

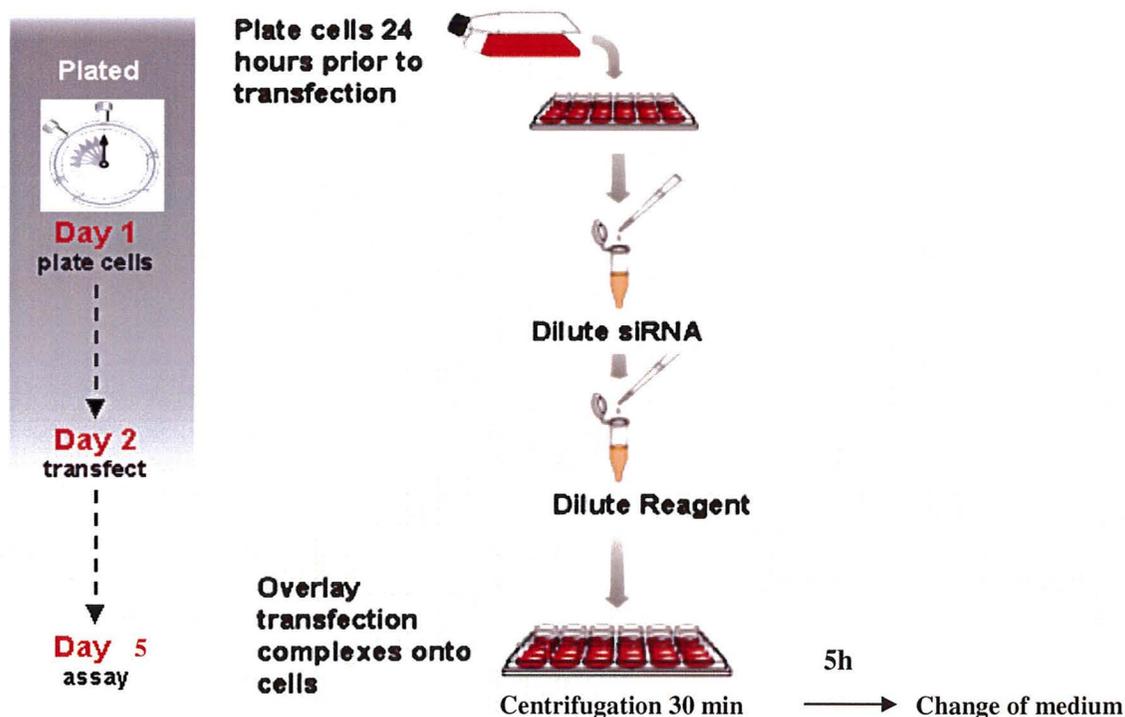


Figure 14 : représentation schématique du protocole expérimental de transfection

#### **4 Immunofluorescence indirecte sur les cellules 293 EBV-GFP**

Des « coverslip », lamelles circulaires de polylysine, sont introduites dans les puits de culture d'une plaque de 6 puits, puis les cellules sont mises en culture et transfectées selon les conditions décrites auparavant. Soixante douze heures après la transfection, les cellules sont fixées sur les lamelles par du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 20 minutes.

Les cellules sont ensuite saturées avec du sérum immun de chèvre pendant 30 minutes à température ambiante (TBS contenant 3% de sérum immun de chèvre, Triton 0,1%) puis incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire anti-gp350 (100 µg/mL, Chemicon) ou anti-Zebra (266 µg/mL, liquide d'ascite de lapin purifié). Les dilutions ont lieu dans du TBS contenant 1% de sérum immun de chèvre, triton 0,1% : dilution au 1/7 pour l'anticorps anti-gp350 et dilution au 1/25 pour l'anticorps anti-Zebra.

Après lavage par du TBS Triton 0,1%, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire dilué au 1/2500 : anticorps anti-souris marqué par l'Alexa Fluor 488 (2 mg/mL, Invitrogene) pour la gp350 et anticorps anti-lapin marqué par l'Alexa Fluor 594 (2 mg/mL, Invitrogene) pour Zebra.

Après plusieurs lavages, les cellules sont fixées sur lame par du moviol et observées par immunofluorescence indirecte avec un microscope Nikon eclipse E600. Des photos ont été prises avec l'appareil photo Nikon Coolpix 8400.

## **5 Quantification des ARNm messagers par RT-PCR en temps réel**

### **5.1 Extraction des ARN messagers**

L'extraction des ARN messagers (ARNm) est réalisée avec le kit High Pure RNA Isolation Kit® (Roche, France) à partir du culot cellulaire d'environ  $10^6$  cellules repris par 200  $\mu$ L de PBS. Les cellules sont lysées avec 200  $\mu$ L de tampon de lyse (4,5 M guanidine hydrochloride, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton X-100, pH=6,6). Ce tampon permet la désorganisation des membranes, la libération des ARN puis leur adsorption spécifique sur une mini colonne constituée de deux couches de fibres de verre. L'ADN contaminant est digéré par deux traitements à la DNase (2 traitements de 180U par culot cellulaire). Les sels, les protéines et les autres impuretés cellulaires sont éliminés par lavages successifs avec deux solutions éthanoliques, la première contenant du guanidine hydrochloride (5M) et du Tris-HCl (20 mM) (pH=6,6), la seconde contenant du NaCl (20 mM) et du Tris-HCl (2 mM) (pH=7,5). L'utilisation de solutions à forte concentration saline provoque la précipitation des protéines. Les ARN restent fixés sur la colonne et sont élués par 50  $\mu$ L de tampon d'éluion. Les ARN sont stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

### **5.2 RT-PCR de l'ARNm de la protéase**

La RT-PCR en temps réel est réalisée sur l'appareil LightCycler avec le kit LC-RNA Master Hybridization® Probes (Roche). Les séquences des amorces et de la sonde Taqman® figurent dans le tableau VII. Le mélange réactionnel est préparé dans un volume final de 20  $\mu$ L, comme indiqué dans le tableau VIII et les caractéristiques de la réaction figurent dans le tableau IX (voir également figure 12 du paragraphe synthèse des siRNA).

**Tableau VII : séquence des amorces et sondes utilisées, RT-PCR protéase**

	séquence
<b>MPR1 sens</b>	5'-CCA CGG CAG TCT ACG GTA CA-3'
<b>MPR2 antisens</b>	5'-ACG ACT CGG CTG GGA TAT TG-3'
<b>Sonde</b>	5'-(6Fam)ACC TTG CGT GGG TCC TGA AGC ACT T(Tamra)-3'

**Tableau VIII : composition du mélange réactionnel, RT-PCR protéase**

Constituant	Volume pour une réaction (µL)
Mn(OAc) <sub>2</sub> (50 mM)	1,3
Amorce sens MPR1 (10 µM)	0,6
Amorce antisens MPR2 (10 µM)	0,6
Sonde Taqman (4 µM)	1
RNA master mix	7,5
Eau	4
ARN extrait	5

**Tableau IX : caractéristiques de la RT-PCR protéase**

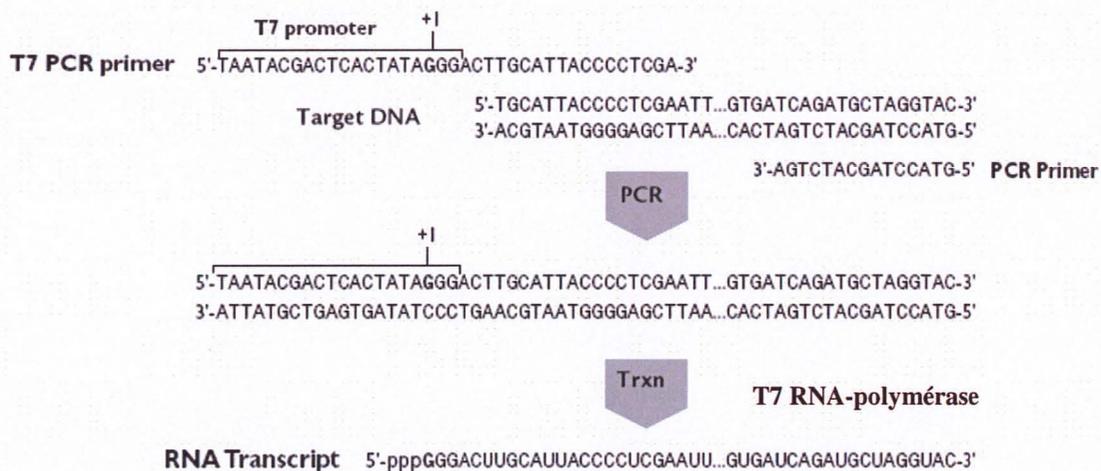
	Température	Durée	Nombre de cycles
<b>Rétro-transcription</b>	61°C	30 s	1
<b>Dénaturation</b>	95°C	3 min	1
<b>Amplification</b>	95°C	10 s	45
	62°C	1 min 30 s	
<b>Refroidissement</b>	40°C	20 s	1

### 5.3 Quantification de l'ARNm de la protéase

Une gamme de transcrits de la protéase a été réalisée pour permettre la quantification des ARN messagers (41).

Le transcrit a été réalisé avec le kit MEGAscript® (Ambion) de la façon suivante. L'ADN de l'EBV a été extrait de cellules B95-8 (High pure DNA isolation kit®, Roche) puis amplifié dans le thermocycleur classique iCycler (Biorad). Cette amplification a été réalisée à l'aide d'une amorce MPR2 et d'une amorce MPR1 modifiée contenant la séquence d'un promoteur T7 du côté 5'. Cette méthode a permis l'obtention de produits de PCR comportant le promoteur T7 et ainsi l'utilisation ultérieure de l'enzyme T7-polymérase (figure 15).

**Figure 15 : obtention d'un transcrit d'ARN à partir d'un produit de PCR**



La composition du mélange réactionnel et les conditions de PCR figurent dans les tableaux ci-dessous (tableaux X et XI) :

**Tableau X : composition du mélange réactionnel de la PCR produisant un ADN comportant le promoteur T7**

Constituant	Volume pour une réaction (µL)
Tampon 10X	10
dNTP (10 mM)	4
T <sub>7</sub> MPR1 (10 µM)	4
MPR1 (10 µM)	4
Taq polymérase	0,5
Eau	68
Extrait	10

**Tableau XI : caractéristiques de la PCR produisant un ADN comportant le promoteur T7**

	Température	Durée	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	5 min	1
<b>Dénaturation</b>	95°C	1 min	35
<b>Hybridation</b>	60°C	1 min	
<b>Elongation</b>	72°C	1 min 30 s	
<b>Refroidissement</b>	72°C	10 s	1

Afin de vérifier que l'amplification a été correcte, les produits de PCR ont été visualisés après migration sur un gel d'agarose.

Ces produits de PCR ont ensuite été transcrits *in vitro* en ARN complémentaire (ARNc) grâce au kit MEGAscript® (Ambion) dans les conditions décrites dans le tableau XII :

**Tableau XII : caractéristiques de la réaction de transcription**

Composant	quantité (µL)
ATP solution	2
CTP	2
GTP	2
UTP	2
Tampon de réaction 10X	2
Produits de PCR (ADN)	1
Enzyme mix (T7 polymérase)	2

L'ADN résiduel a été éliminé par traitement à la DNase pendant 15 minutes à 37°C (TURBO DNase fournie dans le kit, 4U pour chaque transcrit).

L'ARN transcrit a ensuite été extrait et dosé par spectrophotométrie et le résultat converti en nombre de copies. Le nombre de copies (N) est en effet proportionnel à la concentration en ARN (C) et dépend de la masse moléculaire (M) du transcrit.

$$N=C \times A/M$$

La gamme a ensuite été réalisée par dilutions successives du transcrit.

#### 5.4 RT-PCR de l'ARNm de MAPK1

La protéine MAPK1 a été utilisée pour mettre au point l'étape de transfection. L'ARN messager de cette protéine a été quantifié par RT-PCR à l'aide du kit QuantiTect SYBER Green RT-PCR kit® et des amorces QuantiTect Primer assays® (Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur.

#### 5.5 RT-PCR de l'ARNm de la GAPDH

La glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une protéine codée par un gène de ménage dont l'expression est constante dans la cellule. L'ARNm de cette protéine a été quantifié par RT-PCR dans les mêmes extraits cellulaires que ceux utilisés pour quantifier l'ARNm de la protéase. Les conditions de la RT-PCR sont identiques à celles de

la RT-PCR protéase (tableau VIII et IX), les amorces et sondes utilisées sont décrites dans le tableau XIII.

**Tableau XIII : séquence des amorces et sonde utilisées, RT-PCR GAPDH**

	<b>séquence</b>
<b>GAPDH sens</b>	5'-CGT GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC-3'
<b>GAPDH antisens</b>	5'-TGG CAT GGA CTG TGG TCA TG-3'
<b>sonde</b>	5'-(6Fam)AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT GCC TCC T-(Tamra)3'

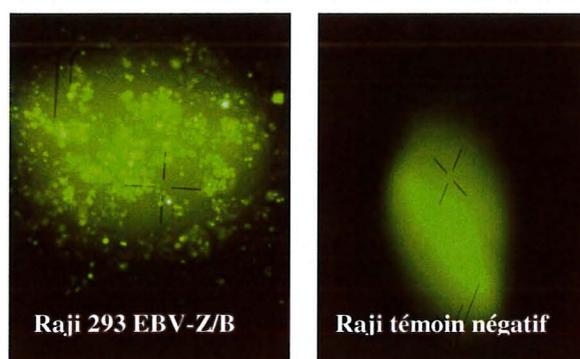
## 6 Western Blot

Les culots cellulaires sont repris par 100  $\mu$ L de tampon de lyse (5 g de sucrose, 380 mg de TRIS à 62,5  $\mu$ M, 18 mg EDTA à 2 mM, pour 50 mL d'eau), 3  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol et 3  $\mu$ L d'un mélange glycérol-pyronine G à 0,1%. La lyse a lieu à 100°C pendant 15 minutes. Les lysats (26  $\mu$ L) sont séparés par migration électrophorétique sur gel de bisacrylamide, puis le gel est transféré sur membrane de nitrocellulose. Après ce transfert, la membrane est saturée avec un mélange de PBS-lait écrémé 5% pendant une heure minimum. A l'issue de cette saturation, la membrane est rincée avec du PBS-Tween 0,1%. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure avec une solution diluée d'anticorps primaire murin : anticorps anti-protéase (0,7 mg/mL, dilution au 1/200), anticorps anti-MAPK1 (0,1 mg/mL, dilution au 1/1000) ou anticorps anti-GAPDH (0,4 mg/mL, dilution au 1/4000). Après rinçage, la membrane est exposée à un autre anticorps : anticorps secondaire anti-IgG murines couplé à la peroxydase. Deux techniques de révélation ont été utilisées : révélation avec de la diaminobenzidine (DAB), substrat de la peroxydase et révélation par Enhanced Chemiluminescence (ECL), chimiluminescence amplifiée. Dans ce dernier cas, la membrane est mise en contact avec un film autoradiographique pendant 1 minute (Western blotting detection reagents®, Amersham). Un témoin positif est réalisé avec de la protéase purifiée.

## 7 Test d'infectiosité des surnageants de culture

Les cellules Raji sont des cellules issues d'un lymphome de Burkitt. Elles contiennent deux délétions dans le génome de l'EBV et de ce fait ne produisent pas de virions. Cependant elles ont la capacité d'être surinfectées par un virus EBV exogène qui apporte dans la cellule les protéines nécessaires à la réactivation du virus endogène. Cette caractéristique est exploitée pour quantifier l'infectiosité des surnageants de culture 293 EBV-GFP :

- $2 \times 10^5$  cellules Raji sont mises en contact avec 1 mL de surnageant de cellules 293 EBV-GFP
- Une centrifugation de 30 minutes à 800 tours/minute permet de favoriser le contact cellules/virus et donc d'améliorer l'infection
- Les cellules sont ensuite incubées 72h sous 5% de  $\text{CO}_2$  à  $37^\circ\text{C}$  puis analysées en microscopie de fluorescence et/ou cytométrie de flux
- Le nombre de cellules fluorescentes (cellules infectées) est proportionnel au nombre de virions EBV-GFP contenu dans le surnageant des cellules 293 EBV-GFP
- Les cellules sont observées avec le microscope Zeiss Axiovert ou analysées par cytométrie de flux avec le cytomètre FC500 (Beckman coulter)



**Figure 16 : observation microscopique des cellules Raji surinfectées par les surnageants de culture.** *A gauche*, cellules Raji surinfectées par le surnageant de cellules 293 EBV-GFP dont le cycle lytique a été induit par les plasmides inducteurs. *A droite*, cellules Raji témoins.

## 8 Evaluation de la production d'interféron

Afin de rechercher une induction du système interféron se traduisant par la présence de deux isoformes de l'enzyme oligoadénylate synthase (OAS1 et OAS2), le kit OneStep RT-PCR® (Qiagen) a été utilisé avec les amorces contenues dans le kit Interferon Response Detection Kit® (system biosciences). La réaction s'est faite dans le thermocycleur iCycler dans les conditions suivantes (tableaux XIV et XV) :

**Tableau XIV : composition du mélange réactionnel, RT-PCR OAS1 et OAS2**

Constituant	Volume pour une réaction (µL)
Tampon 5X	2
dNTP (10 mM)	0,4
Amorces (OAS1 ou OAS2)	0,4
Eau	4,8
Enzyme	0,4
Extrait	2

**Tableau XV : caractéristiques de la RT-PCR, OAS1 et OAS2**

	Température	Durée	Nombre de cycles
<b>Reverse transcription</b>	50°C	40 min	1
<b>Etape d'inactivation de la polymérase</b>	95°C	15 min	1
<b>Dénaturation de l'ADN</b>	95°C	30 s	50
<b>Fixation des amorces</b>	65°C	30 s	
<b>Extension par la polymérase</b>	72	1 min 10s	
<b>Extension finale</b>	72°C	10 min	1

Un témoin a été réalisé avec des cellules 293EBV/GFP traitées par l'acide polyI-polyC (acide polyinosinique-polycytidilique) à la concentration de 2,5 µg/mL. Ce composé est un agent chimique qui induit la production d'interféron par les cellules. De la même façon que pour les siRNA, les cellules sont restées en contact 72 h avec ce produit.

## **9 Test statistiques utilisés**

La significativité des variations étudiées a été évaluée par le student t-test. Les variations ont été considérées significatives pour les valeurs de  $p < 0,05$ .

### III Résultats

---

#### 1 Optimisation des conditions expérimentales

##### 1.1 Quantification des ARNm de la protéase

Afin de pouvoir quantifier l'effet des siRNA sur l'ARNm de la protéase, nous avons utilisé une gamme de transcrits de la protéase. Cette gamme a été réalisée à partir de transcrits qui ont été dilués. Chaque dilution de transcrit a été passée dans plusieurs RT-PCR différentes ce qui a permis de s'assurer de la bonne reproductibilité de la gamme (coefficients de variation inter-manipulation compris entre 2,83 et 4,31, tableau XVI)

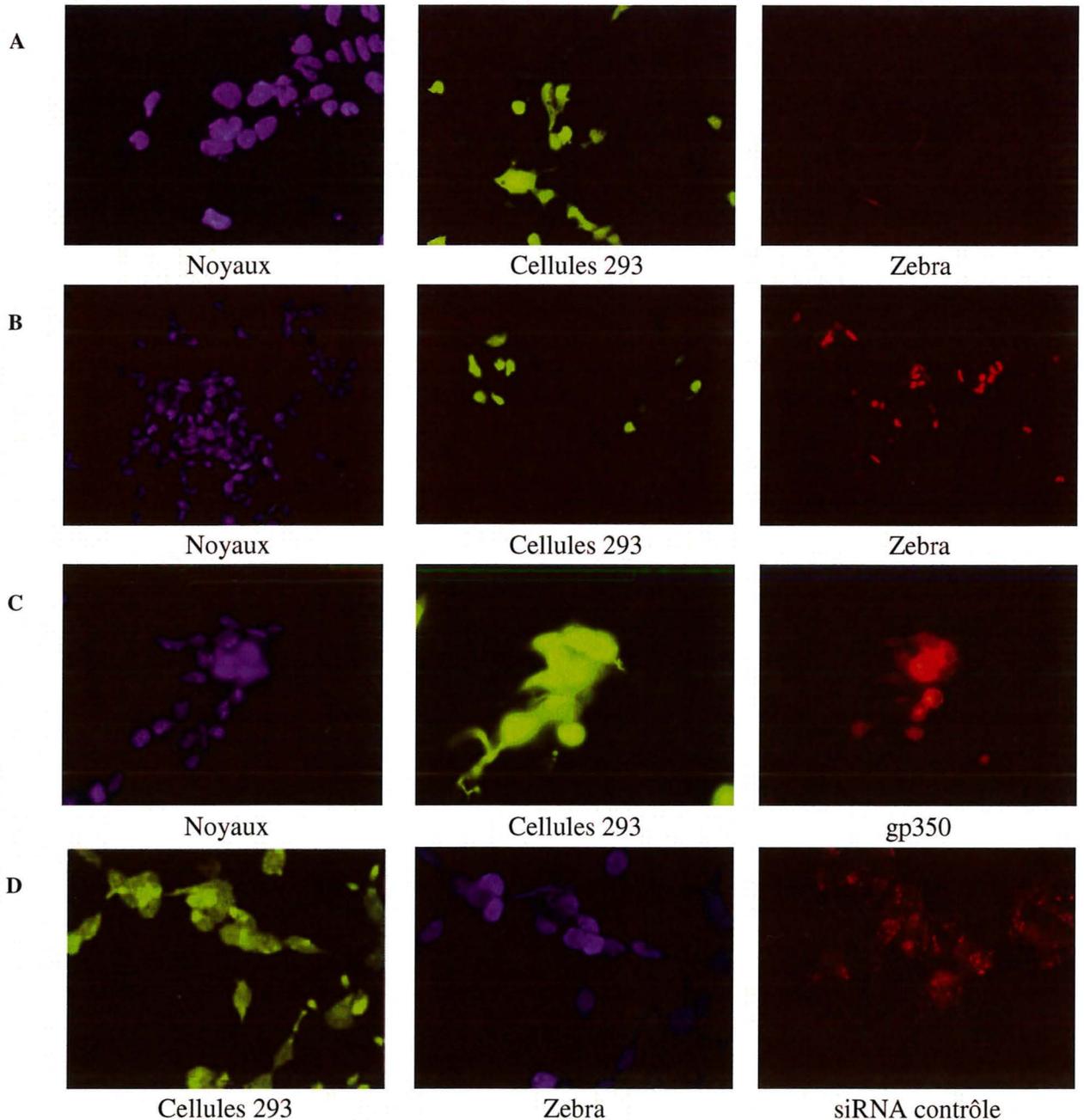
**Tableau XVI : reproductibilité de la gamme de transcrit de la protéase**

Nombre d'échantillon	Dilution (copies/capillaire)	Reproductibilité (coefficient de variation)
10	$5 \times 10^6$	3,16
7	$5 \times 10^5$	3,57
10	$5 \times 10^4$	3,04
7	$5 \times 10^3$	2,83
10	$5 \times 10^2$	4,31

##### 1.2 Transfection

La maîtrise de l'étape de transfection est un pré-requis nécessaire au développement de toute expérience d'ARN interférence. C'est pourquoi nous avons testé trois réactifs de transfection avant de commencer les expériences d'ARN interférence proprement dites. Le siTox (Dharmacon) est un siRNA ciblant une protéine régulant négativement l'apoptose : sa pénétration dans la cellule entraîne une inhibition de cette protéine et déclenche donc l'apoptose. Le pourcentage d'effet cytopathique 72h après la transfection reflète la qualité de cette dernière. Le siTox a permis de tester trois réactifs de transfection à différentes concentrations : la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), le Highperfect (Qiagen) et le JetSi (Polyplus transfection). Les meilleurs résultats de transfection ont été obtenus avec 1  $\mu$ L de JetSi par puits (résultats non montrés). Ce réactif a été retenu pour les expériences suivantes. Le siTox a également été utilisé pour déterminer le pourcentage de confluence cellulaire optimal pour la transfection et le meilleur temps d'exposition entre la transfection et l'analyse (résultats non montrés).

Afin de vérifier que les cellules ont été correctement transfectées par les plasmides inducteurs et/ou les siRNA, la présence du transactivateur Zebra, de la glycoprotéine gp350 ou du siRNA contrôle siGLO Risc-Free® (Dharmacon) a été recherchée par immunofluorescence indirecte (figure 17).



**Figure 17 : Immunofluorescence indirecte sur les cellules 293 EBV-GFP.**

**A** : transfection par pcDNA (objectif x40)

**B** : transfection pas les plasmides inducteurs, recherche de Zebra (objectif x40)

**C** : transfection par les plasmides inducteurs, recherche de la gp350 (objectif x60)

**D** : cotransfection par les plasmides inducteurs et le siRNA contrôle (objectif x60)

*A, B et C* : bleu : noyaux, vert : cellules 293 EBV-GFP, rouge : Zebra ou gp350.

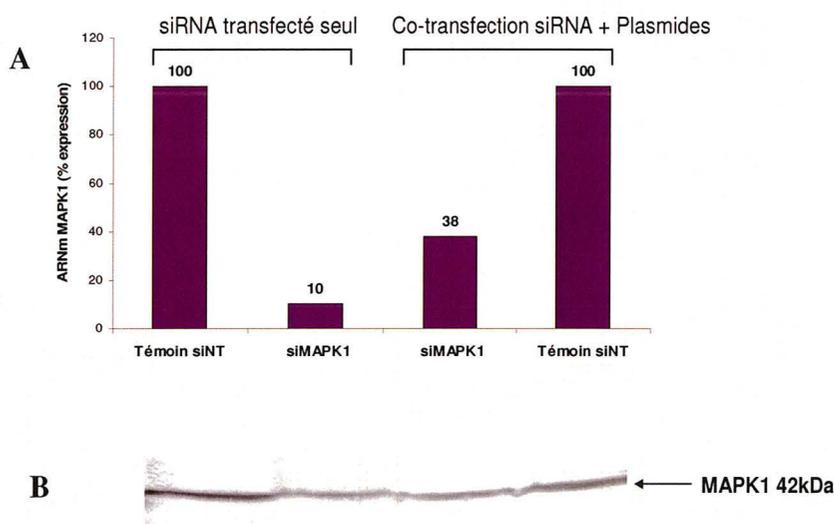
*D* : Bleu : zebra, vert : cellules 293 EBV-GFP, rouge : siRNA contrôle.

Lorsque le plasmide vide pcDNA est transfecté dans les cellules 293 EBV-GFP, il n'y a pas d'induction du cycle lytique et la protéine Zebra n'est pas détectée (figure 17A). Lorsque les deux plasmides inducteurs sont transfectés dans les cellules, la protéine Zebra est détectée ainsi que la protéine gp350, ce qui témoigne d'une activation du cycle lytique (figure 17B et 17C). L'utilisation du siRNA contrôle (siGLO RISC-Free) montre que la cotransfection plasmides inducteurs et siRNA fonctionne : fluorescence bleue correspondant à la protéine Zebra et fluorescence ponctuée rouge correspondant au siRNA contrôle (figure 17D).

La protéine Zebra a été révélée soit par un anticorps secondaire émettant dans le rouge, soit par un anticorps secondaire émettant dans le bleu selon les expériences.

### 1.3 Extinction d'un gène et cotransfection siRNA/plasmides inducteurs

Des siRNA dirigés contre le gène cellulaire MAPK1, gène ubiquitaire impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire, ont été utilisés pour tester l'extinction de gène au niveau moléculaire. Les siRNA anti-MAPK1 sont des siRNA de contrôle fournis par la société Qiagen (figure 18). Les ARNm MAPK1 ont été quantifiés par RT-PCR quantitative en temps réel sur l'appareil LightCycler (Roche) et l'expression de la protéine MAPK1 a été évaluée par Western Blot (figure 18).



**Figure 18 : extinction de l'expression du gène MAPK1 par les siRNAs anti-MAPK1**

A : RT-PCR quantitative des ARNm MAPK1

B : Western Blot MAPK1

siNT : siRNA non targeting

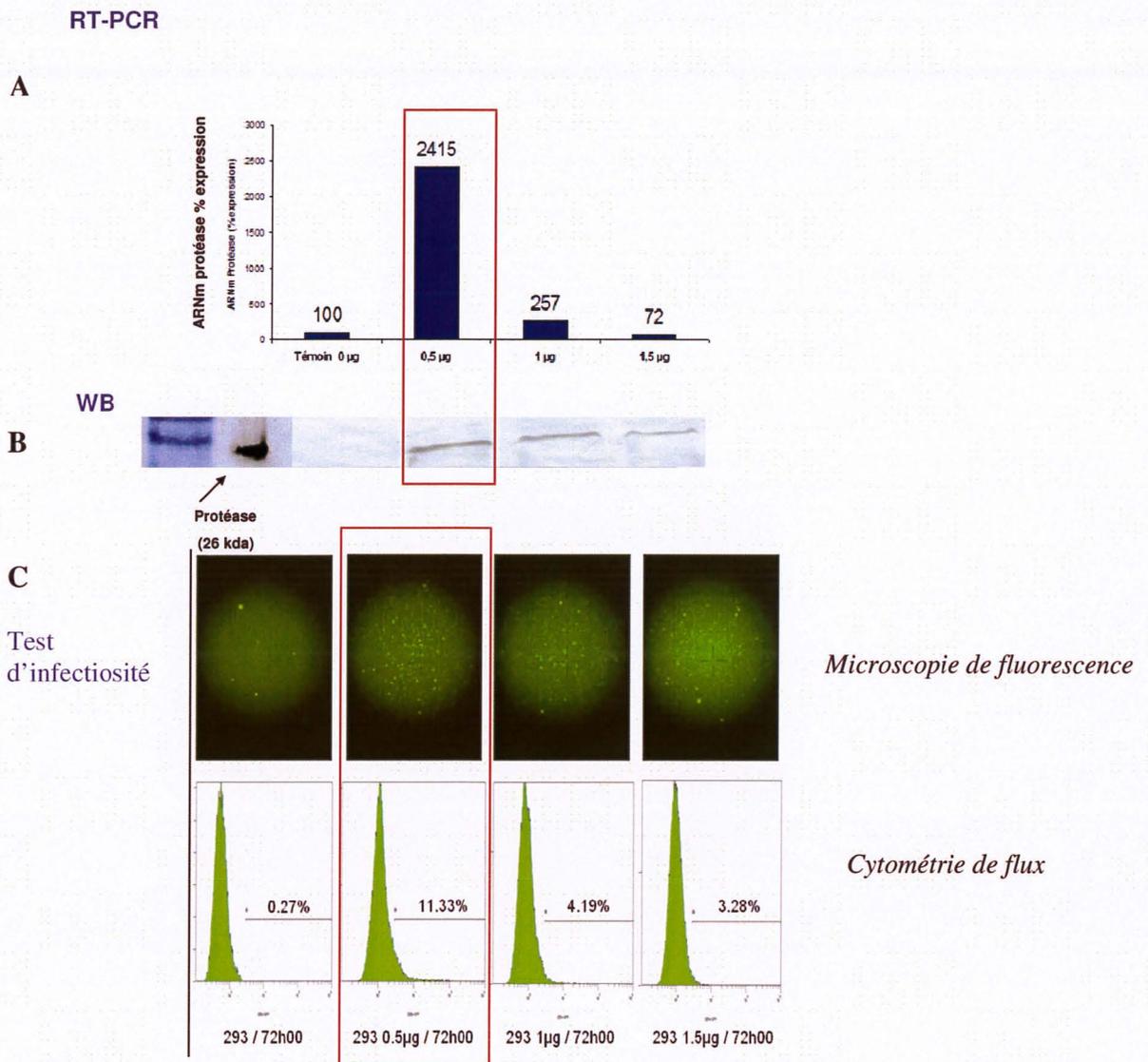
Cette expérience a montré l'efficacité de l'extinction de gène dans le cadre d'une cotransfection des siRNA et des plasmides inducteurs. En effet, l'expression de l'ARNm MAPK1 est inhibée de 62% par rapport à un témoin cotransfecté par les plasmides inducteurs et les siNT. Cependant cette extinction est moins importante que lorsque les siRNA sont transfectés seuls (90% d'extinction).

#### **1.4 Induction de la production de virions EBV dans les cellules 293 EBV-GFP**

Afin d'optimiser l'étape d'induction, différentes concentrations de plasmides inducteurs et différents temps de lecture après transfection ont été testés. L'induction maximale du cycle lytique de l'EBV (ARNm et protéine) et de la production de virions a été obtenue en utilisant 0,5 µg de chaque plasmide par puits avec une lecture à 72h post-transfection (figure 19).

Ce résultat a été observé avec les 3 techniques d'analyse : synthèse maximale de la protéine (intensité maximale de la bande en western blot), quantité maximale d'ARNm (2415% d'expression par rapport au témoin non induit), et induction de fluorescence maximale (11,33% de cellules fluorescentes).

En parallèle à cette expérience, une cinétique de la production des ARNm de la protéase a été réalisée mettant en évidence que la production d'ARNm de la protéase était maximale 72h après l'induction et confirmant que la protéase était produite tardivement au cours du cycle lytique de l'EBV (figure 20).



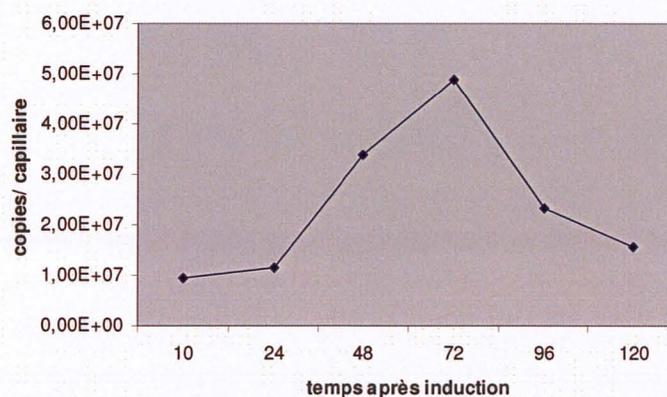
**Figure 19 : induction du cycle lytique avec différentes concentrations de plasmides (0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 µg par puits).**

**A** : RT-PCR quantitative des ARNm protéase

**B** : Western Blot protéase

**C** : Quantification des virions infectieux dans les surnageants de cellules 293 EBV-GFP

Résultats obtenus 72 h après la transfection.



**Figure 20 : cinétique des ARNm de la protéase après induction**

## 2 Inhibition de la réplication de l'EBV par les siRNA

### 2.1 Inhibition par un pool de 4 siRNA dirigés contre la protéase

Différents protocoles expérimentaux ont été testés :

-un protocole simple en une étape où la délivrance des siRNA et l'induction de l'EBV dans les cellules sont simultanés.

-des protocoles plus complexes, dissociés, pour essayer d'augmenter l'effet des siRNA.

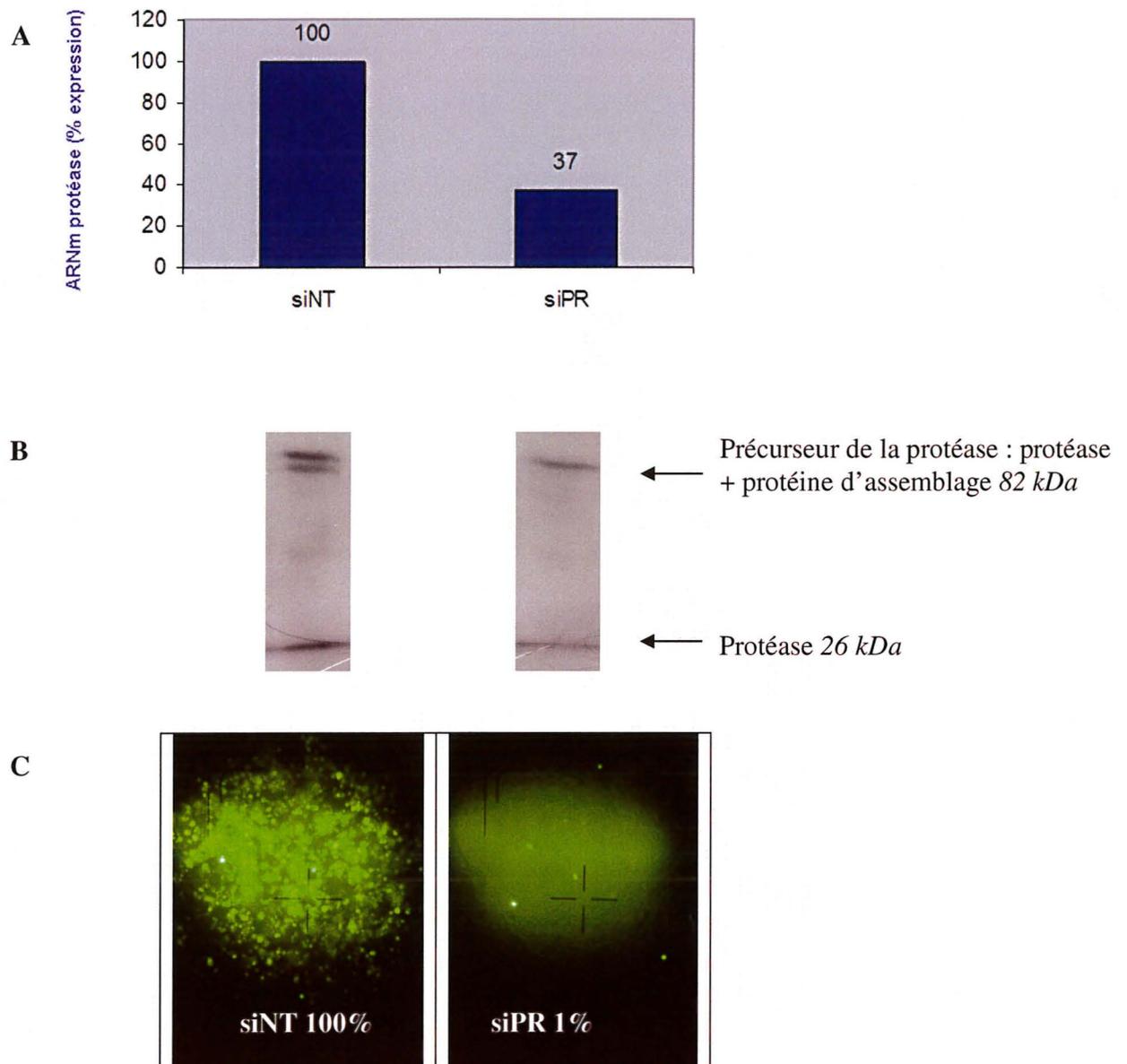
Le pool de siRNA (siPR) correspond à un mélange, en quantité équivalente, de 4 siRNA anti-protéase dont la concentration finale est de 100 nM (soit 25 nM de chaque siRNA).

#### *a Protocole de transfection en une étape*

Le pool (siPR 100 nM) et les plasmides (0,5 µg/mL) sont transfectés dans les cellules 293 EBV-GFP de façon simultanée. Le recueil se fait 72h post-transfection et l'effet des siRNA est évalué par la quantification de l'ARNm de la protéase, par western blot de la protéase et par le test d'infectiosité des surnageants de culture des cellules 293 EBV-GFP (figure 21).

Le protocole en une étape a permis d'obtenir une inhibition de 63% de l'expression de l'ARNm de la protéase par rapport au siNT. L'expression de la protéase a également été réduite : l'intensité de la bande observée à 26 kDa est légèrement plus faible dans les cellules traitées par le pool de siPR par rapport aux cellules traitées par le siNT. Une inhibition plus forte a été observée pour une double bande localisée au dessous de 82 kDa, et qui correspondrait à la forme précurseur de la protéase (protéase plus protéine d'assemblage). Cette inhibition est associée à une diminution de la production des virions infectieux comme le montre l'observation par microscopie de fluorescence des cellules Raji surinfectées par les surnageants de cellules 293 EBV-GFP induites et traitées par les siNT ou siPR. L'analyse par FACS (fluorescence activated cell sorter) permet de quantifier cette inhibition par rapport aux cellules traitées par le siNT à la même concentration (100 nM) : diminution de 99% du titre infectieux dans les cellules traitées par le pool siPR.

Un western blot réalisé sur la protéine GAPDH a montré que l'expression de cette protéine était constante, que les cellules soient transfectées par le siNT ou le pool de siPR (résultat non montré).



**Figure 21 : inhibition de la réplication de l'EBV par un pool de 4 siRNA anti-protéase (100 nM)**

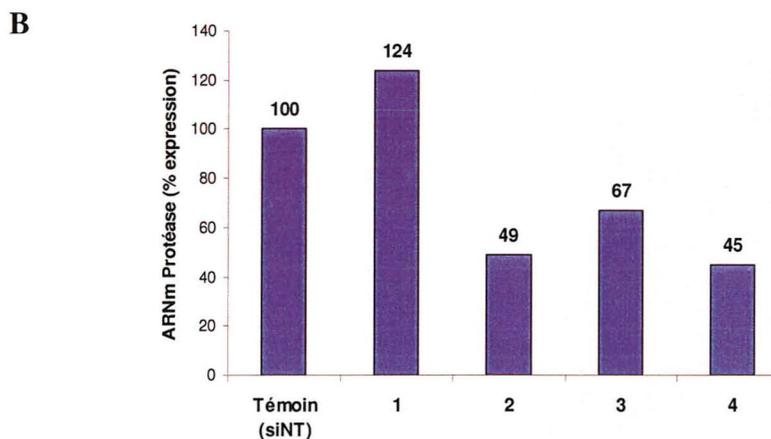
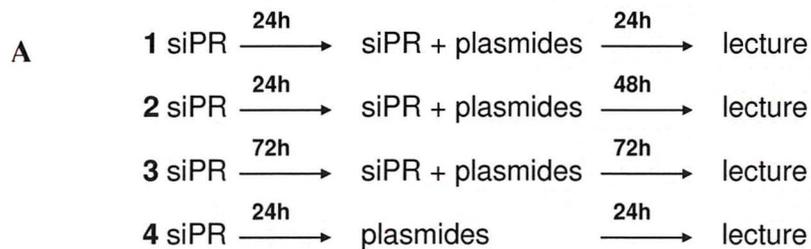
**A** : RT-PCR quantitative des ARNm de la protéase

**B** : Western Blot

**C** : Observation microscopique et cytométrie de flux des cellules Raji surinfectées par les surnageants de culture des cellules 293 EBV-GFP traitées par les siRNA. Les pourcentages sont exprimés par rapport au siNT et correspondent au pourcentage de virions infectieux dans les surnageants des cellules 293.

### *b Protocoles de transfection en deux étapes*

Quatre protocoles différents ont été réalisés (figure 22). Tous comportent une première transfection « préventive » de siRNA anti-protéase (siPR) avant l'induction du cycle lytique par les plasmides. Dans les protocoles 1, 2 et 3, une 2<sup>ème</sup> dose de siPR est délivrée dans les cellules en même temps que les plasmides inducteurs (test d'un éventuel effet « boost » d'une pré-administration de siRNA).



**Figure 22 : résultats des différents protocoles en 2 étapes**

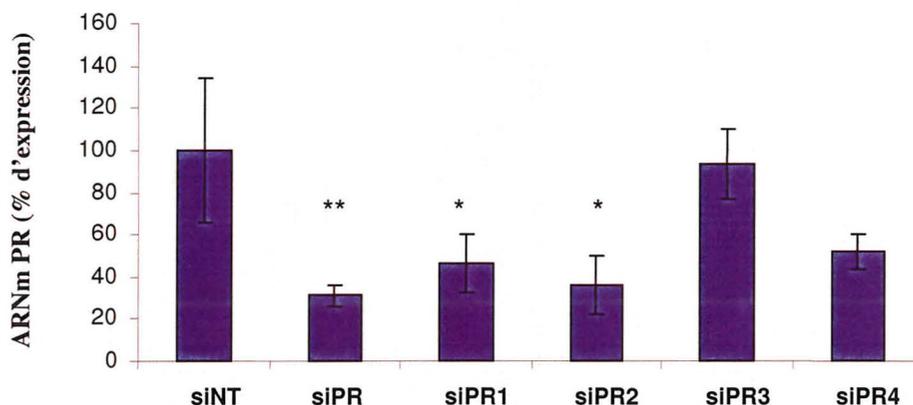
**A** : protocoles

**B** : RT-PCR quantitative de l'ARNm protéase

L'administration préventive des siRNA anti-protéase avant l'induction du cycle lytique n'entraîne pas de bénéfice par rapport à une administration simultanée des siRNA et des plasmides inducteurs. L'effet « boost » ne semble pas non plus améliorer les résultats. Par la suite, toutes les expériences ont été réalisées dans des protocoles en une étape, avec une analyse 72 h après la transfection.

## 2.2 Inhibition par chaque siRNA pris séparément

Les 4 siRNA constituant le pool ont été utilisés séparément, afin d'évaluer leur efficacité respective. Cette expérience a montré que PR1 et PR2 étaient les plus efficaces avec une inhibition significative (student t-test,  $p < 0,05$ ) de 54,3% et 63,7% respectivement. En revanche, PR3 et PR4 n'entraînent pas de diminution significative de l'expression de l'ARNm de la protéase (figure 23).



**Figure 23 : activité de chacun des siRNAs constituant le pool**

Chaque siRNA est utilisé à la concentration de 100 nM.

Les valeurs représentent la moyenne +/- l'écart-type d'une expérience réalisée en quadruplicate

\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,02$  par rapport aux cellules transfectées par le siNT 100 nM (student t-test)

## 2.3 Effet de la concentration sur l'activité inhibitrice des siRNA

### a Effet de fortes concentrations

SiPR1 a été utilisé à 3 concentrations différentes : 100, 50 et 10 nM. L'effet de ces 3 concentrations de siRNA a été évalué par quantification de l'ARNm (expérience en quadruplicate) et par le test d'infectiosité des surnageants de culture (expérience en duplicate) (tableau XVII).

**Tableau XVII : activité inhibitrice de différentes concentrations de siPR1 (fortes concentrations de siRNA)**

Les pourcentages sont calculés par rapport à la valeur obtenue pour le siNT (si non targeting)

siRNA et concentration (nM)	% d'expression de l'ARNm protéase	% de virions infectieux dans les surnageants de cellules 293 EBV-GFP
siPR1 100	9	0,4
siPR1 50	10	2,3
siPR1 10	7	3,7
siNT 100	100	100

Cette expérience a montré une diminution de l'expression de l'ARNm de la protéase et une diminution de l'infectiosité des surnageants de culture des cellules 293 EBV-GFP traitées par les siRNA anti-protéase par rapport aux cellules traitées par le siNT. En effet, quelle que soit la concentration utilisée, l'activité de siPR1 est significative par rapport au siNT 100 nM (test de student,  $p < 0,05$ ).

Cependant, l'activité du siRNA ne diffère pas en fonction de la concentration utilisée, que ce soit au niveau du pourcentage d'expression de l'ARNm de la protéase ou au niveau du pourcentage de virions infectieux dans les surnageants de culture des cellules 293 EBV-GFP. En effet il n'y a pas de différence significative entre les différentes concentrations testées (test de student,  $p > 0,05$ ). Les concentrations utilisées sont probablement très élevées par rapport à la concentration inhibitrice 50%, ce qui signifie que l'activité du siRNA est déjà maximale. (L'utilisation de concentrations plus élevées ne permettrait donc pas d'obtenir une activité plus importante.) La quantification des messagers d'un gène de ménage, le gène de la GAPDH, a été réalisée sur les mêmes extraits cellulaires que ceux utilisés pour quantifier l'ARNm de la protéase dans le but de mettre en évidence une éventuelle action toxique et/ou non spécifique des siRNA anti-protéase sur les cellules. Aucune différence significative ( $p > 0,05$  ; student t-test) n'a été observée entre les cellules traitées par le siNT et les cellules traitées par siPR1 (résultat non montré).

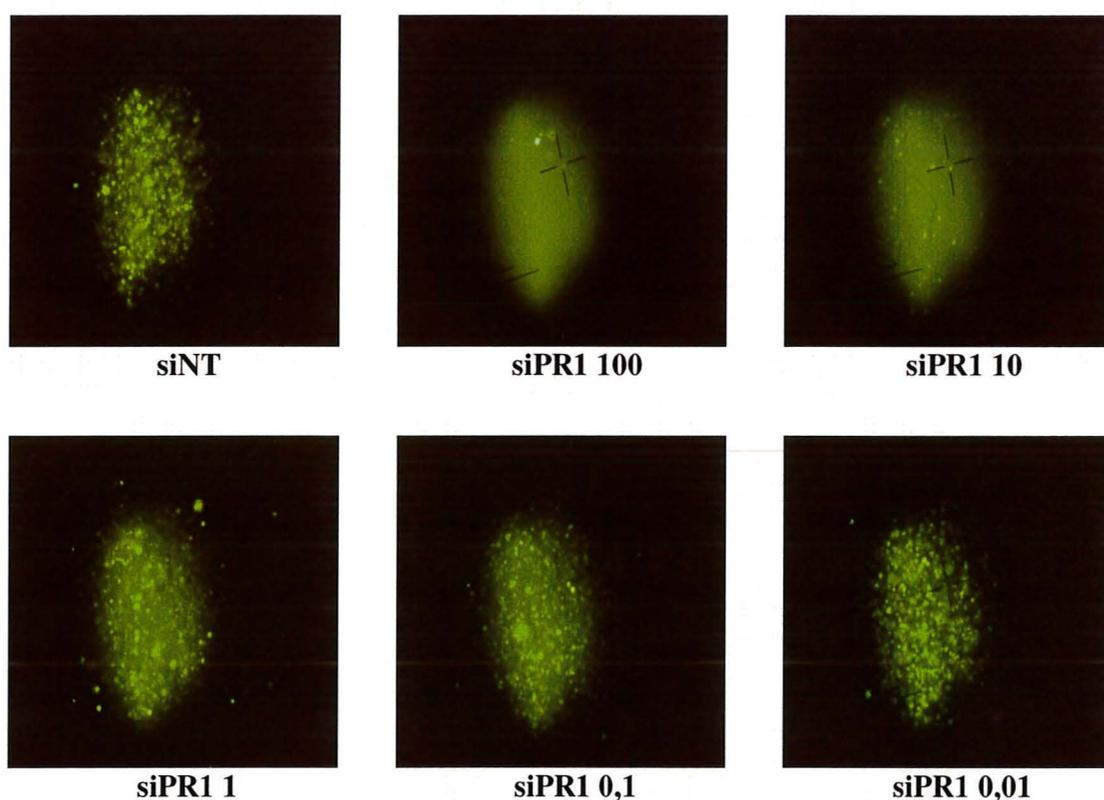
### *b Effet de faibles concentrations*

De nouvelles dilutions de siPR1 ont été réalisées : 10 ; 1 ; 0,1 et 0,01 nM. L'effet des dilutions a été évalué par RT-PCR de l'ARNm de la protéase, par le test d'infectiosité des surnageants de culture (expériences réalisées en quadruplicate) et par western blot de la protéase.

Avec ces nouvelles concentrations, une diminution de l'expression de l'ARNm de la protéase et une diminution de l'infectiosité des surnageants de culture des cellules 293 EBV-GFP traitées par les siRNA ont également été mises en évidence (tableau XVIII et figure 24).

La quantité d'ARN messager de la protéase a été réduite de 72,9%, 51,3%, 44,7% et 13% avec les concentrations de 10, 1, 0,1 et 0,01 nM respectivement. Le pourcentage de virions infectieux dans les surnageants de culture traités par les siRNA a été réduit de 84,6%, 71,1%, 49,4% et 31,6% avec ces mêmes concentrations. A la différence des concentrations utilisées auparavant, l'activité de PR1 diffère de façon significative en fonction des

concentrations utilisées (test de student,  $p < 0,05$ ). Il existe une relation linéaire entre le pourcentage d'expression de l'ARNm de la protéase ou le pourcentage de virions infectieux dans le surnageant de culture et le logarithme de la concentration de siPR1, indiquant que l'effet du siRNA varie avec la concentration (coefficients de corrélation linéaire de 0,94 et 0,99 respectivement, figure 26). Les concentrations inhibitrices 50% calculées à l'aide de ces données sont de 1,8 nM pour les résultats correspondant à l'ARNm de la protéase et de 0,09 nM pour les résultats correspondant à la surinfection des cellules Raji.

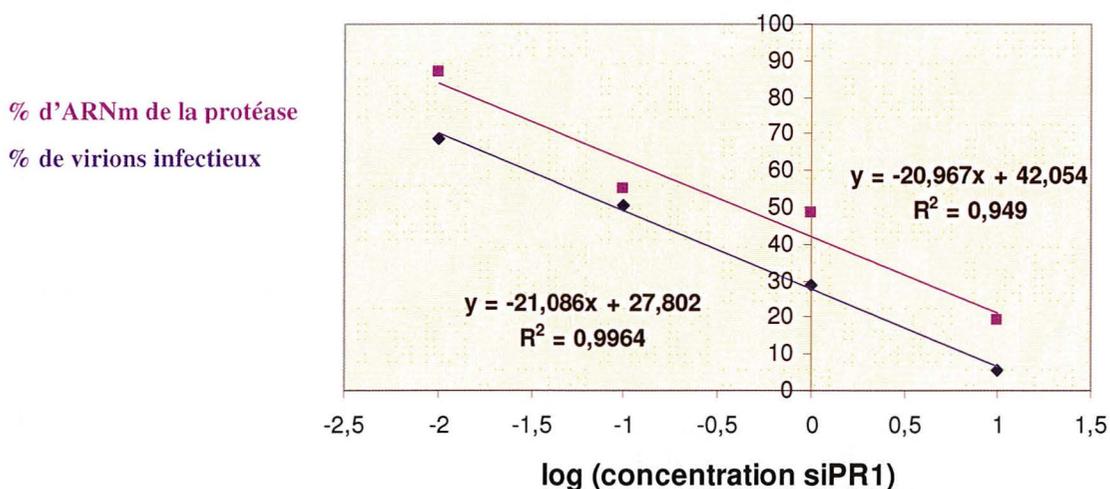


**Figure 24 : microscopie de fluorescence des cellules Raji surinfectées par les surnageants de cellules 293 EBV-GFP induites et traitées par les siRNA**  
Effet de siPR1 aux concentrations suivantes : 100 ; 10 ; 1 ; 0,1 et 0,01 nM.

**Tableau XVIII : activité inhibitrice de différentes concentrations de siPR1 (faibles concentrations de siRNA)**

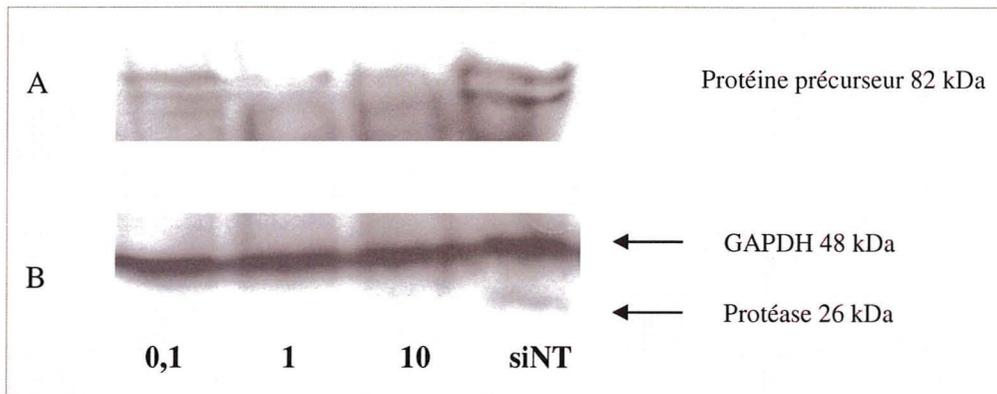
Les pourcentages sont calculés par rapport à la valeur obtenue pour le siNT (si non targeting)

siRNA et concentration (nM)	% expression des ARNm protéase	% de virions infectieux dans les surnageants de cellules 293 EBV-GFP
siPR1 10	27,1	5,4
siPR1 1	48,7	28,9
siPR1 0,1	55,2	50,6
siPR1 0,01	87	68,4
siNT 100	100	100



**Figure 25 : corrélation entre le logarithme de la concentration de siPR1 et le pourcentage d'expression de l'ARNm de la protéase ou le pourcentage de virions infectieux dans le surnageant.**

En ce qui concerne le niveau d'expression de la protéine (figure 26), l'effet dose est surtout visible au niveau de la protéine précurseur de la protéase où l'on observe une diminution de l'intensité des bandes principalement aux concentrations de 1 et 10 nM. Néanmoins, une diminution de l'intensité de la bande située au niveau 26 kDa est observée pour siPR1 à toutes les concentrations par rapport au siNT, même si l'effet dose est moins visible.



**Figure 26 : western blot de la protéase**

Effet du siNT et de siPR1 aux concentrations de 0,1 ; 1 et 10 nM

A : visualisation des bandes correspondant à la polyprotéine précurseur

B : visualisation de la protéase

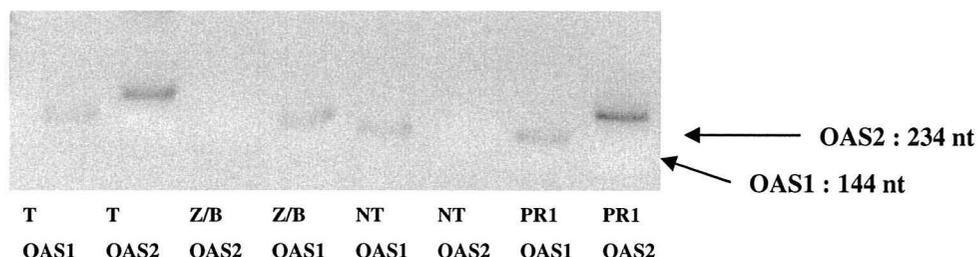
### 3 Evaluation de la production d'interféron

La production d'interféron dans les cellules a été évaluée par la présence des gènes OAS1 et OAS2. En effet, il a été suggéré par certains auteurs que l'introduction des siRNA dans la cellule pourrait activer la réponse immunitaire innée et ainsi induire la production d'interféron. La stimulation de la voie de l'interféron entraîne l'activation des ISG (interferon stimulated genes). Parmi ces gènes figurent des gènes codant pour deux isoformes OAS1 et OAS2 de l'oligoadénylate synthase. Pour tester la spécificité d'action des siRNA que nous avons utilisés, nous avons donc mis au point une RT-PCR permettant de détecter les gènes OAS1 et OAS2.

Trois conditions ont été testées en présence d'un témoin positif :

- Cellules 293 EBV-GFP dont le cycle lytique de l'EBV a été induit par les plasmides codant pour Zebra et BALF4 (cellules induites)
- Cellules 293 EBV-GFP induites et traitées par le siNT 100 nM
- Cellules 293 EBV-GFP induites et traitées par le siPR1 à la concentration de 100 nM

La présence d'OAS1 seule a été observée dans les cellules induites ainsi que dans les cellules induites et traitées par le siNT. Dans les cellules induites et traitées par le siPR1, la présence d'OAS1 et d'OAS2 a été observée (figure 27).



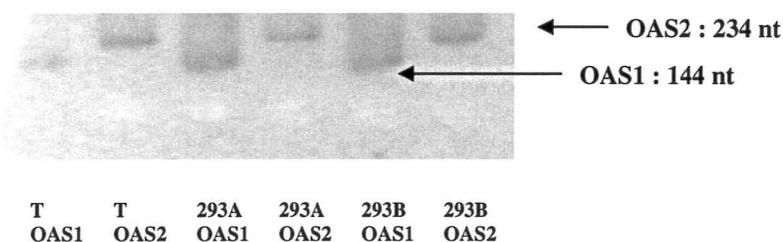
**Figure 27 : expression de l'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP traitées par siPR1.**

OAS1 et OAS2 ont une taille qui correspond à 234 nucléotides (nt) et 144 nt respectivement.

T : témoin positif; Z/B : cellules induites par zebra et balf4 ; NT : cellules induites et traitées par un siNT 100 nM; PR1 : cellules induites et traitées par siPR1 100 nM

Ces premiers résultats montrent que l'oligoadénylate synthase (isoforme OAS1) est présente dans les cellules, cela même en l'absence de siRNA. La présence des deux isoformes OAS1 et OAS2 dans les cellules traitées par siPR1 par rapport à la seule présence d'OAS1 dans les cellules traitées par le siNT est difficile à expliquer et des expériences complémentaires seraient nécessaires pour interpréter cette différence. Néanmoins, la présence d'une seule des deux isoformes de l'OAS témoigne déjà d'une activation du système interféron.

Afin de vérifier que l'étape d'induction du cycle lytique n'était pas responsable de ce phénomène, une deuxième expérience a été réalisée pour rechercher la présence de l'oligoadénylate synthase dans des cellules où le cycle lytique de l'EBV n'avait pas été induit. Cette deuxième expérience a montré qu'il existait une synthèse d'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP avant l'induction du cycle lytique (figure 28). Il n'est donc pas possible de conclure avec ces expériences à propos de la stimulation ou non du système interféron par les siRNA anti-protéase.



**Figure 28 : expression de l'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP non induites.**

T : témoin positif ; 293A et 293B : cellules 293 EBV-GFP non induites

## IV Discussion

---

Le virus d'Epstein Barr est un *herpesviridae* lymphotrope et épithéliotrope, potentiellement oncogène pour ces deux types cellulaires. C'est l'un des rares virus humains à avoir été associé au développement de cancers. Le cycle lytique du virus pourrait être impliqué dans l'apparition de ces cancers. Les antiviraux actuels étant peu efficaces contre l'EBV, de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être recherchées. La protéase du virus produite pendant le cycle lytique a une séquence conservée au sein des *herpesviridae* et est nécessaire à la formation d'une capsidie virale mature. Cette protéine pourrait donc être une cible intéressante pour développer de nouveaux traitements anti-EBV. Nous avons utilisé des siRNA anti-protéase, dans le but d'inhiber la réplication du virus.

La délivrance des siRNA dans les cellules est un point crucial de la stratégie d'ARN interférence. Un siRNA contrôle fluorescent a permis de vérifier que la pénétration des siRNA dans les cellules était correcte. Simultanément à la transfection des siRNA, il est nécessaire d'apporter dans les cellules 293 EBV-GFP les gènes BZLF1 et BALF4 afin d'induire le cycle lytique et la synthèse de la protéase, ce qui implique une double transfection. Afin de vérifier que cette double transfection était possible, nous avons tout d'abord testé l'action d'un siRNA dirigé contre la kinase cellulaire MAPK1, seul ou en association avec les plasmides inducteurs. Cette expérience a entraîné une inhibition de 62% de l'expression du gène codant pour la protéine MAPK1. Cependant l'inhibition a été plus importante (90%) lorsque le siRNA MAPK1 a été utilisé seul. Une inhibition de 63% du gène de la protéase a été observée après cotransfection des siRNA anti-protéase et des plasmides inducteurs. Une solution à ce problème serait d'utiliser des cellules spontanément productrices de virions (où il n'est pas nécessaire d'induire le cycle lytique) telles que les lignées lymphoïdes B EBV positives P3HR1 et B95-8. Cependant la transfection des lymphocytes B est difficile et nécessite l'utilisation de techniques d'électroporation difficiles à mettre en œuvre. Une autre solution pour délivrer les siRNA dans les cellules serait d'utiliser des vecteurs viraux. (L'utilisation de ces vecteurs sera discutée plus loin.) La délivrance des siRNA dans la cellule et au niveau des sites de réplication virale *in vivo* est également l'un des obstacles majeurs prévenant l'utilisation de

l'ARN interférence chez l'homme. Certains artifices peuvent être utilisés pour améliorer la capture cellulaire, comme la formation de structures de type liposome (91).

L'utilisation d'un pool de quatre siRNA dirigés contre différentes régions du transcrite de la protéase a permis d'obtenir une diminution moyenne de 63% de l'expression de l'ARNm de la protéase et une diminution de 99% de la production de virions dans les cellules 293 EBV-GFP. Le siRNA le plus actif a été sélectionné et étudié plus particulièrement. Ce siRNA a été dilué et plusieurs concentrations ont été testées. Ces expériences ont montré qu'il existait une relation de dose-effet, avec une diminution de l'activité lorsque la concentration diminue. Les concentrations inhibitrices 50% calculées sont de 1,8 nM lorsque les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'ARNm de la protéase et de 0,09 nM lorsque les résultats sont évalués par le test d'infectiosité des surnageants de culture. Les siRNA sont donc actifs à de très faibles concentrations et l'augmentation de la concentration (25 nM et 100 nM) n'a pas permis d'augmenter l'effet des siRNA. La concentration inhibitrice 50% est rarement mentionnée dans les études d'ARN interférence, cependant ces concentrations sont similaires aux concentrations de 3 et 0,5 nM rapportées dans une étude évaluant l'activité de siRNA dirigés contre le virus de l'hépatite B (91).

Afin d'améliorer l'effet inhibiteur des siRNA anti-protéase, nous avons testé plusieurs protocoles. L'utilisation conjointe de PR1 et PR2 ne s'est pas traduit par une inhibition plus importante, suggérant l'absence d'effet additif des 2 siRNA dirigés contre la même cible. Des protocoles en plusieurs étapes ont été testés afin de rechercher une éventuelle action préventive des siRNA ou un effet « boost » lié à une pré-administration de siRNA. Ces protocoles n'ont pas permis d'améliorer les résultats. D'autres stratégies peuvent être envisagées afin d'optimiser l'action des siRNA anti-protéase. L'association de plusieurs siRNA ciblant différentes régions du génome viral pourrait être plus efficace que l'action d'un seul siRNA. De telles combinaisons ont été décrites dans la littérature pour le SARS-coronavirus et le VHB (18, 146). Une de nos perspectives serait de cibler en plus de la protéase, deux protéines du cycle lytique de l'EBV : la protéine transactivatrice Zebra (antigène très précoce) et la glycoprotéine d'enveloppe gp350 (antigène tardif) par des siRNA. Certains auteurs ayant rapporté un effet antiprolifératif grâce à l'inhibition de l'expression de certaines protéines de latence de l'EBV par des siRNA (62, 82, 88, 142), une autre stratégie envisageable serait d'associer le blocage du cycle lytique à une inhibition des protéines de latence. En ciblant une protéine de latence, la protéine Zebra et

la protéase, une activité maximale pourrait être obtenue. Enfin, les siRNA pourraient être utilisés en association aux antiviraux classiques. En effet, une étude *in vitro* sur des cellules d'hépatocarcinome a montré que l'utilisation conjointe de siRNA et de la lamivudine était plus efficace que l'utilisation des siRNA seuls ou de la lamivudine seule pour diminuer la réplication du VHB (80)

L'activité des siRNA dans le temps n'a pas été étudiée ici, mais il est admis que l'effet des siRNA nus est transitoire (87) et ne dure que quelques jours, le processus d'amplification des siRNA dépendant de la *RNA dependant RNA polymerase* chez *C.elegans* n'existant pas dans les cellules de mammifères. Cette inhibition transitoire pourrait cependant être efficace dans le cas d'infections aiguës, l'administration locale de siRNA en intranasal chez des souris infectées par l'influenza virus ou le coronavirus associé au SARS s'étant révélée bénéfique (44, 79, 124). Cependant dans le cas d'infections chroniques comme dans le cas des cancers associés à l'EBV, un effet prolongé serait nécessaire. Certaines modifications chimiques permettent d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des siRNA. Par exemple, la conjugaison au cholestérol par une liaison pyrrolidone permet d'augmenter la demi-vie (120), et la conjugaison au polyéthylène glycol (PEG) *via* un lien disulfure permet d'améliorer la stabilité (70). Des stratégies ont été développées afin d'induire un effet prolongé dans les cellules de mammifères. Il existe 2 stratégies principales : l'utilisation de vecteurs plasmidiques et l'utilisation de vecteurs viraux (23). La première stratégie correspond à l'insertion des siRNA dans un vecteur plasmidique contenant une RNA polymérase III permettant l'expression de siRNA à partir d'une structure en épingle à cheveux (shRNA) ou à partir de siRNA en tandem (brins sens et antisens venant de promoteurs séparés). La deuxième stratégie correspond aux rétrovirus, lentivirus ou adénovirus qui délivrent des shRNA dans les cellules. Ces vecteurs viraux infectent facilement la plupart des cellules, y compris les cellules difficiles à transfecter. Les vecteurs de type adénovirus n'infectant pas les lymphocytes, notre perspective est d'utiliser un vecteur de type rétrovirus pour délivrer stablement les siRNA dans des cellules épithéliales mais aussi dans des cellules lymphoïdes.

Les premières utilisations de l'ARN interférence ont laissé penser que les petites molécules d'ARNdb introduites n'activaient pas la réponse immunitaire de type interféron (29). Cette hypothèse est maintenant remise en question. L'utilisation de plusieurs siRNA dirigés contre CCR5 afin d'empêcher la pénétration du VIH dans les cellules a induit la synthèse

des interleukines 6 et 8 (98). Des siRNA ciblant les lamines A et C ou encore la GAPDH ont induit une augmentation de stat 1, une protéine induite par l'interféron. D'autres protéines codées par les ISG (interferon stimulated gens) ont été testées, certaines ont été induites quelle que soit la concentration de siRNA utilisée, d'autres seulement par les fortes concentrations (119). Plusieurs facteurs interviendraient dans l'induction du système interféron par les siRNA. La séquence nucléotidique, le type cellulaire utilisé pourraient avoir un rôle (65, 106). L'introduction de modifications chimiques dans les siRNA permettrait non seulement d'augmenter la stabilité mais également de supprimer la stimulation du système interféron par certains siRNA (91). Cependant, la stimulation du système interféron par les siRNA n'est pas recherchée dans toutes les études, et lorsque cette recherche a lieu, l'induction du système interféron n'est pas toujours retrouvée. Nous avons retrouvé une ou deux isoformes de l'oligoadénylate synthase dans les cellules 293 EBV-GFP, avant toute transfection par les siRNA ce qui suggère que le système interféron est d'emblée activé dans ces cellules. Il a d'ailleurs été montré que l'ARN viral EBER1, ARN viral qui appartient au cycle de latence de l'EBV et non traduit en protéine, serait capable d'activer l'OAS. La signification de ce mécanisme régulateur n'est pas encore bien comprise et certaines protéines de l'EBV produites plus tardivement au cours du cycle lytique pourraient au contraire avoir un effet inhibiteur sur l'OAS (115). Il est donc difficile de conclure quant à l'induction du système interféron par les siRNA anti-protéase. Une mesure quantitative de la production d'interféron dans les cellules 293 EBV-GFP, avant et après utilisation des siRNA, pourrait permettre de répondre à cette question. L'analyse de la production d'interféron dans des cellules épithéliales 293 EBV négatives, avant et après administration des siRNA serait une autre piste.

Les travaux d'ARN interférence déjà réalisés sur le virus d'Epstein-Barr, en ciblant principalement des protéines de latence, ont montré qu'il était possible de ralentir ou d'inhiber la prolifération cellulaire et d'obtenir une action anticancéreuse. Nos travaux ont montré qu'il était également possible d'inhiber la réplication du virus en ciblant une protéine du cycle lytique de l'EBV. Cette étude a été réalisée sur des cellules épithéliales EBV positives. Ces cellules sont un outil facile à utiliser car leur transfection est aisée et il est possible de déterminer rapidement, grâce à la présence de la GFP, le titre infectieux des surnageants de culture traités par les siRNA anti-protéase. Ce modèle pourrait servir pour évaluer l'activité antivirale de siRNA ciblant d'autres protéines, d'association de siRNA ou d'autres molécules antivirales. Cependant, il s'agit d'un modèle artificiel et il serait

souhaitable de compléter cette étude par des travaux sur des lignées cellulaires issues des différents types de cancers associés à l'EBV : des lignées dérivées d'un lymphome de Burkitt, des cellules issues de carcinomes indifférenciés du nasopharynx ou des lignées lymphoblastoïdes qui constituent un modèle cellulaire des lymphomes chez l'immunodéprimé. Ce travail est un premier pas dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine des cancers associés à l'EBV et complète l'ensemble des travaux réalisés, montrant que l'ARN interférence pourrait être une nouvelle voie dans la lutte contre les infections virales.

## **CONCLUSION**

---

**THESE SOUTENUE PAR** : Ariane BAS

**TITRE** : Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr : étude *in vitro* de l'inhibition du cycle lytique du virus par ARN interférence.

## CONCLUSION

Ce travail présente l'utilisation d'une nouvelle stratégie thérapeutique, l'ARN interférence, pour inhiber la réplication du virus d'Epstein-Barr dans l'optique de lutter contre les cancers associés à ce virus. Cette stratégie, qui a été découverte de manière fortuite dans les années 1990, correspond à un processus cellulaire qui entraîne la dégradation spécifique d'un ARN messager. Elle a d'abord été utilisée à large échelle pour étudier la fonctionnalité des gènes chez les nématodes et chez les humains puis des travaux ont montré que cette stratégie pouvait être utilisée *in vitro* et *in vivo* pour inhiber une infection virale en ciblant des gènes viraux ou cellulaires.

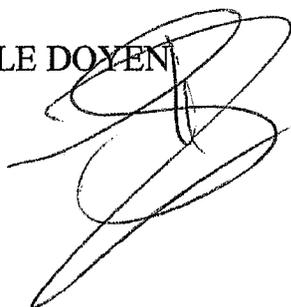
Initialement connu comme l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse, le virus d'Epstein Barr joue également un rôle dans la survenue de certains cancers, entraînant alors une prolifération lymphoïde ou épithéliale. La protéase du virus est produite pendant le cycle lytique du virus qui aboutit à la production de particules virales. Si les protéines de latence du virus ont un rôle majeur dans les phénomènes de transformation cellulaire associés à l'EBV, le cycle lytique pourrait également être impliqué dans la pathogénèse de certains cancers. Dans le but d'inhiber la réplication virale, nous avons dessiné quatre siRNA (small interfering RNA) dirigés contre la protéase et apprécié leur efficacité dans un modèle de cellules épithéliales EBV positives, capables d'exprimer le cycle lytique complet du virus. Après l'optimisation des conditions expérimentales, les 4 siRNA ont été testés en mélange à 100 nM. L'activité de ce pool a été évaluée par RT-PCR de l'ARNm de la protéase, par western blot de la protéase et par mesure du titre infectieux des surnageants de culture. Une diminution de 63% de l'ARNm de la protéase, une diminution de l'expression de la protéine et une diminution de 99% de l'infectiosité des surnageants de culture ont été mises en évidence. Chaque siRNA a ensuite été testé individuellement. Le siRNA le plus actif, siPR1, a montré une activité dose dépendante, avec une concentration inhibitrice 50% de 1,8 nM lorsque l'effet est évalué au niveau de l'ARNm et de 0,09 nM lorsque celui-ci est évalué par l'infectiosité des surnageants de culture. Ces résultats encourageants obtenus *in vitro* sur un modèle de cellules épithéliales devront être

complétés par des études sur des lignées cellulaires issues des différents types de cancers associés à l'EBV : des lignées dérivées d'un lymphome de Burkitt, des cellules issues de carcinomes indifférenciés ou des lignées lymphoblastoïdes qui constituent un modèle cellulaire des lymphomes chez l'immunodéprimé. A plus long terme, une étude *in vivo* serait souhaitable. Ce travail est un premier pas dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine des cancers associés à l'EBV et complète l'ensemble des travaux réalisés, montrant que l'ARN interférence pourrait être une nouvelle voie dans la lutte contre les infections virales.

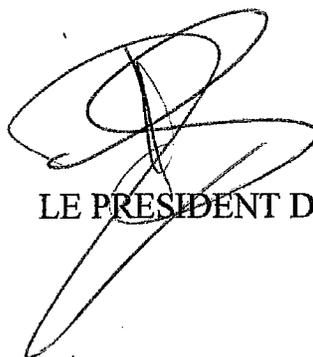
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 23/10/07

LE DOYEN



LE PRESIDENT DE LA THESE



## **BIBLIOGRAPHIE**

---

1. **Adams, L. A., B. Deboer, G. Jeffrey, R. Marley, and G. Garas.** 2006. Ganciclovir and the treatment of Epstein-Barr virus hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* **21**:1758-60.
2. **Ambros, V.** 2000. Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **10**:428-33.
3. **Andersson, M. G., P. C. Haasnoot, N. Xu, S. Berenjian, B. Berkhout, and G. Akusjarvi.** 2005. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* **79**:9556-65.
4. **Bai, L., L. Wei, J. Wang, X. Li, and P. He.** 2006. Extended effects of human papillomavirus 16 E6-specific short hairpin RNA on cervical carcinoma cells. *Int J Gynecol Cancer* **16**:718-29.
5. **Balfour, H. H., Jr., K. M. Hokanson, R. M. Schacherer, C. M. Fietzer, D. O. Schmeling, C. J. Holman, H. E. Vezina, and R. C. Brundage.** 2007. A virologic pilot study of valacyclovir in infectious mononucleosis. *J Clin Virol* **39**:16-21.
6. **Behr, J., M. Schaefer, E. Littmann, R. Klingebiel, and A. Heinz.** 2006. Psychiatric symptoms and cognitive dysfunction caused by Epstein-Barr virus-induced encephalitis. *Eur Psychiatry* **21**:521-2.
7. **Bennasser, Y., S. Y. Le, M. Benkirane, and K. T. Jeang.** 2005. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* **22**:607-19.
8. **Blaszczyk, J., J. E. Tropea, M. Bubunenko, K. M. Routzahn, D. S. Waugh, D. L. Court, and X. Ji.** 2001. Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* **9**:1225-36.
9. **Borza, C. M., and L. M. Hutt-Fletcher.** 2002. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* **8**:594-9.
10. **Bossolasco, S., K. I. Falk, M. Ponzoni, N. Ceserani, F. Crippa, A. Lazzarin, A. Linde, and P. Cinque.** 2006. Ganciclovir is associated with low or undetectable Epstein-Barr virus DNA load in cerebrospinal fluid of patients with HIV-related primary central nervous system lymphoma. *Clin Infect Dis* **42**:e21-5.
11. **Buisson, M., J. F. Hernandez, D. Lascoux, G. Schoehn, E. Forest, G. Arlaud, J. M. Seigneurin, R. W. Ruigrok, and W. P. Burmeister.** 2002. The crystal structure of the Epstein-Barr virus protease shows rearrangement of the processed C terminus. *J Mol Biol* **324**:89-103.
12. **Buisson, M., L. Rivail, J. F. Hernandez, M. Jamin, J. Martinez, R. W. Ruigrok, and W. P. Burmeister.** 2006. Kinetics, inhibition and oligomerization of Epstein-Barr virus protease. *FEBS Lett* **580**:6570-8.
13. **Chalk, A. M., C. Wahlestedt, and E. L. Sonnhammer.** 2004. Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:264-74.
14. **Chan, D. W., and I. O. Ng.** 2006. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* **208**:372-80.
15. **Chang, J., and J. M. Taylor.** 2003. Susceptibility of human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *J Virol* **77**:9728-31.
16. **Chang, Y., S. S. Chang, H. H. Lee, S. L. Doong, K. Takada, and C. H. Tsai.** 2004. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gen Virol* **85**:1371-9.
17. **Chen, C. C., T. M. Ko, H. I. Ma, H. L. Wu, X. Xiao, J. Li, C. M. Chang, P. Y. Wu, C. H. Chen, J. M. Han, C. P. Yu, K. S. Jeng, C. P. Hu, and M. H. Tao.** 2007. Long-term inhibition of hepatitis B virus in transgenic mice by double-

- stranded adeno-associated virus 8-delivered short hairpin RNA. *Gene Ther* **14**:11-9.
18. **Chen, Z., Z. F. Xu, J. J. Ye, H. P. Yao, S. Zheng, and J. Y. Ding.** 2005. Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**:236-41.
  19. **Cheng, T. L., W. W. Chang, I. J. Su, M. D. Lai, W. Huang, H. Y. Lei, and W. T. Chang.** 2005. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:820-30.
  20. **Cockfield, S. M.** 2001. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl Infect Dis* **3**:70-8.
  21. **Cogoni, C., and G. Macino.** 2000. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* **10**:638-43.
  22. **Cottier, V., A. Barberis, and U. Luthi.** 2006. Novel yeast cell-based assay to screen for inhibitors of human cytomegalovirus protease in a high-throughput format. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:565-71.
  23. **Cullen, B. R.** 2006. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther* **13**:503-8.
  24. **Curtis, R. E., L. B. Travis, P. A. Rowlings, G. Socie, D. W. Kingma, P. M. Banks, E. S. Jaffe, G. E. Sale, M. M. Horowitz, R. P. Witherspoon, D. A. Shriner, D. J. Weisdorf, H. J. Kolb, K. M. Sullivan, K. A. Sobocinski, R. P. Gale, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr., and H. J. Deeg.** 1999. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood* **94**:2208-16.
  25. **Daibata, M., K. Bandobashi, M. Kuroda, S. Imai, I. Miyoshi, and H. Taguchi.** 2005. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity in vitro and in vivo. *J Virol* **79**:5875-9.
  26. **Das, A. T., T. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, M. Vink, M. Madiredjo, R. Bernards, and B. Berkhout.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* **78**:2601-5.
  27. **Dautry, F., and C. Ribet.** 2004. [RNA interference: towards a functional genomics in mammalian cells?]. *Med Sci (Paris)* **20**:815-9.
  28. **Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8245-50.
  29. **Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl.** 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-8.
  30. **Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber, and T. Tuschl.** 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**:199-213.
  31. **Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl.** 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**:6877-88.
  32. **Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr.** 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**:702-3.
  33. **Evans, A. S., J. C. Niederman, and R. N. Sawyer.** 1971. Prospective studies of a group of Yale University freshmen. II. Occurrence of acute respiratory infections and rubella. *J Infect Dis* **123**:271-8.

34. **Fafi-Kremer, S., P. Morand, J. P. Brion, P. Pavese, M. Baccard, R. Germi, O. Genoulaz, S. Nicod, M. Jolivet, R. W. Ruigrok, J. P. Stahl, and J. M. Seigneurin.** 2005. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* **191**:985-9.
35. **Fafi-Kremer, S., J. M. Seigneurin, and P. Morand.** 2007. La mononucléose infectieuse (MNI) "revisitée". *Virologie* **11**:13-26.
36. **Faulkner, G. C., S. R. Burrows, R. Khanna, D. J. Moss, A. G. Bird, and D. H. Crawford.** 1999. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* **73**:1555-64.
37. **Faulkner, G. C., A. S. Krajewski, and D. H. Crawford.** 2000. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* **8**:185-9.
38. **Feng, P., E. C. Ren, D. Liu, S. H. Chan, and H. Hu.** 2000. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J Gen Virol* **81**:2417-23.
39. **Feng, W. H., G. Hong, H. J. Delecluse, and S. C. Kenney.** 2004. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol* **78**:1893-902.
40. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-11.
41. **Fronhoffs, S., G. Totzke, S. Stier, N. Wernert, M. Rothe, T. Bruning, B. Koch, A. Sachinidis, H. Vetter, and Y. Ko.** 2002. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **16**:99-110.
42. **Fujii, T., M. Saito, E. Iwasaki, T. Ochiya, Y. Takei, S. Hayashi, A. Ono, N. Hirao, M. Nakamura, K. Kubushiro, K. Tsukazaki, and D. Aoki.** 2006. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol* **29**:541-8.
43. **Gao, X., H. Wang, and T. Sairenji.** 2004. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or c-myc in EBV-positive epithelial cells. *J Virol* **78**:11798-806.
44. **Ge, Q., L. Filip, A. Bai, T. Nguyen, H. N. Eisen, and J. Chen.** 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8676-81.
45. **Germi, R., P. Morand, K. Brengel-Pesce, S. Fafi-Kremer, O. Genoulaz, C. Ginevra, M. Ballout, G. Barges, and J. M. Seigneurin.** 2004. Quantification of gp350/220 Epstein-Barr virus (EBV) mRNA by real-time reverse transcription-PCR in EBV-associated diseases. *Clin Chem* **50**:1814-7.
46. **Gershburg, E., K. Hong, and J. S. Pagano.** 2004. Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1900-3.
47. **Gershburg, E., and J. S. Pagano.** 2005. Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *J Antimicrob Chemother* **56**:277-81.
48. **Gershburg, E., S. Raffa, M. R. Torrisi, and J. S. Pagano.** 2007. Epstein-Barr virus-encoded protein kinase (BGLF4) is involved in production of infectious virus. *J Virol* **81**:5407-12.
49. **Giladi, H., M. Ketzinel-Gilad, L. Rivkin, Y. Felig, O. Nussbaum, and E. Galun.** 2003. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* **8**:769-76.

50. **Gimenez-Barcons, M., B. Clotet, and M. A. Martinez.** 2007. Endoribonuclease-prepared siRNAs induce effective and specific inhibition of HIV-1 replication. *J Virol*.
51. **Gitlin, L., J. K. Stone, and R. Andino.** 2005. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol* **79**:1027-35.
52. **Glick, M., and M. E. Pliskin.** 1990. Regression of oral hairy leukoplakia after oral administration of acyclovir. *Gen Dent* **38**:374-5.
53. **Grundhoff, A., C. S. Sullivan, and D. Ganem.** 2006. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *Rna* **12**:733-50.
54. **Gu, W., L. Putral, K. Hengst, K. Minto, N. A. Saunders, G. Leggatt, and N. A. McMillan.** 2006. Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and in vivo with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Cancer Gene Ther* **13**:1023-32.
55. **Hall, A. H., and K. A. Alexander.** 2003. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J Virol* **77**:6066-9.
56. **Hall, I. M., K. Noma, and S. I. Grewal.** 2003. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:193-8.
57. **Herrmann, K., P. Frangou, J. Middeldorp, and G. Niedobitek.** 2002. Epstein-Barr virus replication in tongue epithelial cells. *J Gen Virol* **83**:2995-8.
58. **Ho, M., G. Miller, R. W. Atchison, M. K. Breinig, J. S. Dummer, W. Andiman, T. E. Starzl, R. Eastman, B. P. Griffith, R. L. Hardesty, and et al.** 1985. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* **152**:876-86.
59. **Hochberg, D., T. Souza, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, and D. A. Thorley-Lawson.** 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* **78**:5194-204.
60. **Hong, G. K., M. L. Gulley, W. H. Feng, H. J. Delecluse, E. Holley-Guthrie, and S. C. Kenney.** 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* **79**:13993-4003.
61. **Hong, G. K., P. Kumar, L. Wang, B. Damania, M. L. Gulley, H. J. Delecluse, P. J. Polverini, and S. C. Kenney.** 2005. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol* **79**:13984-92.
62. **Hong, M., Y. Murai, T. Kutsuna, H. Takahashi, K. Nomoto, C. M. Cheng, S. Ishizawa, Q. L. Zhao, R. Ogawa, B. V. Harmon, K. Tsuneyama, and Y. Takano.** 2006. Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**:1-8.
63. **Hopwood, P. A., L. Brooks, R. Parratt, B. J. Hunt, M. Bokhari, J. A. Thomas, M. Yacoub, and D. H. Crawford.** 2002. Persistent Epstein-Barr virus infection: unrestricted latent and lytic viral gene expression in healthy immunosuppressed transplant recipients. *Transplantation* **74**:194-202.

64. **Ichim, T. E., M. Li, H. Qian, I. A. Popov, K. Rycerz, X. Zheng, D. White, R. Zhong, and W. P. Min.** 2004. RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant* **4**:1227-36.
65. **Judge, A. D., V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, and I. MacLachlan.** 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* **23**:457-62.
66. **Kanda, T., R. Steele, R. Ray, and R. B. Ray.** 2007. Small interfering RNA targeted to hepatitis C virus 5' nontranslated region exerts potent antiviral effect. *J Virol* **81**:669-76.
67. **Kanda, T., B. Zhang, Y. Kusov, O. Yokosuka, and V. Gauss-Muller.** 2005. Suppression of hepatitis A virus genome translation and replication by siRNAs targeting the internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1217-23.
68. **Kennerdell, J. R., and R. W. Carthew.** 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**:896-8.
69. **Kim, D. H., and J. J. Rossi.** 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* **8**:173-84.
70. **Kim, S. H., J. H. Jeong, S. H. Lee, S. W. Kim, and T. G. Park.** 2006. PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *J Control Release* **116**:123-9.
71. **Kira, T., S. P. Grill, G. E. Dutschman, J. S. Lin, F. Qu, Y. Choi, C. K. Chu, and Y. C. Cheng.** 2000. Anti-Epstein-Barr virus (EBV) activity of beta-L-5-iododioxolane uracil is dependent on EBV thymidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3278-84.
72. **Kogelnik, A. M., K. Loomis, M. Hoegh-Petersen, F. Rosso, C. Hischier, and J. G. Montoya.** 2006. Use of valganciclovir in patients with elevated antibody titers against Human Herpesvirus-6 (HHV-6) and Epstein-Barr Virus (EBV) who were experiencing central nervous system dysfunction including long-standing fatigue. *J Clin Virol* **37 Suppl 1**:S33-8.
73. **Korf, M., D. Jarczak, C. Beger, M. P. Manns, and M. Kruger.** 2005. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. *J Hepatol* **43**:225-34.
74. **Kronke, J., R. Kittler, F. Buchholz, M. P. Windisch, T. Pietschmann, R. Bartenschlager, and M. Frese.** 2004. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* **78**:3436-46.
75. **Kusov, Y., T. Kanda, A. Palmenberg, J. Y. Sgro, and V. Gauss-Muller.** 2006. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J Virol* **80**:5599-610.
76. **Lau, T. S., Y. Li, M. Kameoka, T. B. Ng, and D. C. Wan.** 2007. Suppression of HIV replication using RNA interference against HIV-1 integrase. *FEBS Lett* **581**:3253-9.
77. **Lea, J. S., N. Sunaga, M. Sato, G. Kalahasti, D. S. Miller, J. D. Minna, and C. Y. Muller.** 2007. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reprod Sci* **14**:20-8.
78. **Leung, R. K., and P. A. Whittaker.** 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* **107**:222-39.
79. **Li, B. J., Q. Tang, D. Cheng, C. Qin, F. Y. Xie, Q. Wei, J. Xu, Y. Liu, B. J. Zheng, M. C. Woodle, N. Zhong, and P. Y. Lu.** 2005. Using siRNA in

- prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* **11**:944-51.
80. **Li, G. Q., W. Z. Xu, J. X. Wang, W. W. Deng, D. Li, and H. X. Gu.** 2007. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* **13**:2324-7.
  81. **Li, W. X., H. Li, R. Lu, F. Li, M. Dus, P. Atkinson, E. W. Brydon, K. L. Johnson, A. Garcia-Sastre, L. A. Ball, P. Palese, and S. W. Ding.** 2004. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1350-5.
  82. **Li, X., X. Liu, C. Y. Li, Y. Ding, D. Chau, G. Li, H. F. Kung, M. C. Lin, and Y. Peng.** 2006. Recombinant adeno-associated virus mediated RNA interference inhibits metastasis of nasopharyngeal cancer cells in vivo and in vitro by suppression of Epstein-Barr virus encoded LMP-1. *Int J Oncol* **29**:595-603.
  83. **Li, X. P., G. Li, Y. Peng, H. F. Kung, and M. C. Lin.** 2004. Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:212-8.
  84. **MacGinley, R., P. B. Bartley, T. Sloots, and D. W. Johnson.** 2001. Epstein-Barr virus encephalitis in a renal allograft recipient diagnosed by polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid and successfully treated with ganciclovir. *Nephrol Dial Transplant* **16**:197-8.
  85. **Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, and P. D. Zamore.** 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**:607-20.
  86. **McCaffrey, A. P., H. Nakai, K. Pandey, Z. Huang, F. H. Salazar, H. Xu, S. F. Wieland, P. L. Marion, and M. A. Kay.** 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* **21**:639-44.
  87. **McManus, M. T., and P. A. Sharp.** 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**:737-47.
  88. **Mei, Y. P., X. F. Zhu, J. M. Zhou, H. Huang, R. Deng, and Y. X. Zeng.** 2006. siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett* **232**:189-98.
  89. **Mentzer, S. J., S. P. Perrine, and D. V. Faller.** 2001. Epstein--Barr virus post-transplant lymphoproliferative disease and virus-specific therapy: pharmacological re-activation of viral target genes with arginine butyrate. *Transpl Infect Dis* **3**:177-85.
  90. **Molesworth, S. J., C. M. Lake, C. M. Borza, S. M. Turk, and L. M. Hutt-Fletcher.** 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* **74**:6324-32.
  91. **Morrissey, D. V., J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan, and B. Polisky.** 2005. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* **23**:1002-7.
  92. **Mueller, N., A. Evans, N. L. Harris, G. W. Comstock, E. Jellum, K. Magnus, N. Orentreich, B. F. Polk, and J. Vogelstein.** 1989. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* **320**:689-95.

93. **Murono, S., N. Raab-Traub, and J. S. Pagano.** 2001. Prevention and inhibition of nasopharyngeal carcinoma growth by antiviral phosphonated nucleoside analogs. *Cancer Res* **61**:7875-7.
94. **Naher, H., S. Helfrich, M. Hartmann, and U. K. Freese.** 1990. [EBV replication and therapy of oral hairy leukoplakia using acyclovir]. *Hautarzt* **41**:680-2.
95. **Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen.** 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.
96. **Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson, and N. R. Cooper.** 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* **61**:1416-20.
97. **Niu, X. Y., Z. L. Peng, W. Q. Duan, H. Wang, and P. Wang.** 2006. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer* **16**:743-51.
98. **Pauls, E., J. Senserrich, M. Bofill, B. Clotet, and J. A. Este.** 2007. Induction of interleukins IL-6 and IL-8 by siRNA. *Clin Exp Immunol.* **147**:189-96.
99. **Perrine, S. P., O. Hermine, T. Small, F. Suarez, R. O'Reilly, F. Boulad, J. Fingerroth, M. Askin, A. Levy, S. J. Mentzer, M. Di Nicola, A. M. Gianni, C. Klein, S. Horwitz, and D. V. Faller.** 2007. A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* **109**:2571-8.
100. **Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F. A. Grasser, L. F. van Dyk, C. K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, G. Randall, B. D. Lindenbach, C. M. Rice, V. Simon, D. D. Ho, M. Zavolan, and T. Tuschl.** 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* **2**:269-76.
101. **Pfleger, A., E. Eber, H. Popper, and M. S. Zach.** 2000. Chronic interstitial lung disease due to Epstein-Barr virus infection in two infants. *Eur Respir J* **15**:803-6.
102. **Phipps, K. M., A. Martinez, J. Lu, B. A. Heinz, and G. Zhao.** 2004. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism. *Antiviral Res* **61**:49-55.
103. **Qin, Z. L., P. Zhao, M. M. Cao, and Z. T. Qi.** 2007. siRNAs targeting terminal sequences of the SARS-associated coronavirus membrane gene inhibit M protein expression through degradation of M mRNA. *J Virol Methods.*
104. **Qu, F., T. Ren, and T. J. Morris.** 2003. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* **77**:511-22.
105. **Ren, X. R., L. J. Zhou, G. B. Luo, B. Lin, and A. Xu.** 2005. Inhibition of hepatitis B virus replication in 2.2.15 cells by expressed shRNA. *J Viral Hepat* **12**:236-42.
106. **Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W. S. Marshall, and A. Khvorova.** 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *Rna* **12**:988-93.
107. **Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall, and A. Khvorova.** 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**:326-30.
108. **Roth, B. M., G. J. Pruss, and V. B. Vance.** 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* **102**:97-108.

109. **Schmidt, W., I. Anagnostopoulos, and H. Scherubl.** 2000. Virostatic therapy for advanced lymphoproliferation associated with the Epstein-Barr virus in an HIV-infected patient. *N Engl J Med* **342**:440-1.
110. **Schneider, U., M. Ruhnke, H. J. Delecluse, H. Stein, and D. Huhn.** 2000. Regression of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in patients with acquired immunodeficiency syndrome during therapy with foscarnet. *Ann Hematol* **79**:214-6.
111. **Schramm, C., J. F. Schlaak, and P. R. Galle.** 2000. Rapid development of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease after cessation of foscarnet therapy in an HIV-infected patient. *Int J STD AIDS* **11**:609-10.
112. **Schutz, S., and P. Sarnow.** 2006. Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* **344**:151-7.
113. **Seigneurin, J. M., F.-K. S., M. Baccard, and P. Morand.** 2006. Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection. *Cahier de formation Bioforma, Paris.*
114. **Shannon-Lowe, C. D., B. Neuhierl, G. Baldwin, A. B. Rickinson, and H. J. Delecluse.** 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:7065-70.
115. **Sharp, T. V., D. A. Raine, D. R. Gewert, B. Joshi, R. Jagus, and M. J. Clemens.** 1999. Activation of the interferon-inducible (2'-5') oligoadenylate synthetase by the Epstein-Barr virus RNA, EBER-1. *Virology* **257**:303-13.
116. **Shin, D., S. I. Kim, M. Kim, and M. Park.** 2006. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs targeted to the viral X gene in mice. *Virus Res* **119**:146-53.
117. **Silva, J., K. Chang, G. J. Hannon, and F. V. Rivas.** 2004. RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* **23**:8401-9.
118. **Sixbey, J. W., S. M. Lemon, and J. S. Pagano.** 1986. A second site for Epstein-Barr virus shedding: the uterine cervix. *Lancet* **2**:1122-4.
119. **Sledz, C. A., M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, and B. R. Williams.** 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**:834-9.
120. **Soutschek, J., A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R. K. Pandey, T. Racie, K. G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan, and H. P. Vornlocher.** 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**:173-8.
121. **Stein, P., P. Svoboda, M. Anger, and R. M. Schultz.** 2003. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* **9**:187-92.
122. **Tang, S., M. Tao, J. P. McCoy, Jr., and Z. M. Zheng.** 2006. Short-term induction and long-term suppression of HPV16 oncogene silencing by RNA interference in cervical cancer cells. *Oncogene* **25**:2094-104.
123. **Thorley-Lawson, D. A.** 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**:75-82.
124. **Tompkins, S. M., C. Y. Lo, T. M. Tumpey, and S. L. Epstein.** 2004. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:8682-6.
125. **Torre, D., and R. Tambini.** 1999. Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis* **31**:543-7.

126. **Tynell, E., E. Aurelius, A. Brandell, I. Julander, M. Wood, Q. Y. Yao, A. Rickinson, B. Akerlund, and J. Andersson.** 1996. Acyclovir and prednisolone treatment of acute infectious mononucleosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* **174**:324-31.
127. **Uprichard, S. L., B. Boyd, A. Althage, and F. V. Chisari.** 2005. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:773-8.
128. **van der Horst, C., J. Joncas, G. Ahronheim, N. Gustafson, G. Stein, M. Gurwith, G. Fleisher, J. Sullivan, J. Sixbey, S. Roland, and et al.** 1991. Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* **164**:788-92.
129. **van Rij, R. P., and R. Andino.** 2006. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol* **24**:186-93.
130. **Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal, and R. A. Martienssen.** 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**:1833-7.
131. **Wakisaka, N., T. Yoshizaki, N. Raab-Traub, and J. S. Pagano.** 2005. Ribonucleotide reductase inhibitors enhance cidofovir-induced apoptosis in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Int J Cancer* **116**:640-5.
132. **Walling, D. M., C. M. Flaitz, and C. M. Nichols.** 2003. Epstein-Barr virus replication in oral hairy leukoplakia: response, persistence, and resistance to treatment with valacyclovir. *J Infect Dis* **188**:883-90.
133. **Wang, X., W. J. Kenyon, Q. Li, J. Mullberg, and L. M. Hutt-Fletcher.** 1998. Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* **72**:5552-8.
134. **Wang, Z., L. Ren, X. Zhao, T. Hung, A. Meng, J. Wang, and Y. G. Chen.** 2004. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J Virol* **78**:7523-7.
135. **Wassenegger, M.** 2005. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**:13-6.
136. **Weiss, L. M., J. G. Strickler, R. A. Warnke, D. T. Purtilo, and J. Sklar.** 1987. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **129**:86-91.
137. **Westerhout, E. M., M. Ooms, M. Vink, A. T. Das, and B. Berkhout.** 2005. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res* **33**:796-804.
138. **Wilson, J. A., and C. D. Richardson.** 2005. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* **79**:7050-8.
139. **Wu, H. L., L. R. Huang, C. C. Huang, H. L. Lai, C. J. Liu, Y. T. Huang, Y. W. Hsu, C. Y. Lu, D. S. Chen, and P. J. Chen.** 2005. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* **128**:708-16.
140. **Wu, K. L., X. Zhang, J. Zhang, Y. Yang, Y. X. Mu, M. Liu, L. Lu, Y. Li, Y. Zhu, and J. Wu.** 2005. Inhibition of Hepatitis B virus gene expression by single and dual small interfering RNA treatment. *Virus Res* **112**:100-7.
141. **Yamato, K., J. Fen, H. Kobuchi, Y. Nasu, T. Yamada, T. Nishihara, Y. Ikeda, M. Kizaki, and M. Yoshinouchi.** 2006. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Cancer Gene Ther* **13**:234-41.



142. **Yin, Q., and E. K. Flemington.** 2006. siRNAs against the Epstein Barr virus latency replication factor, EBNA1, inhibit its function and growth of EBV-dependent tumor cells. *Virology* **346**:385-93.
143. **Ying, R. S., C. Zhu, X. G. Fan, N. Li, X. F. Tian, H. B. Liu, and B. X. Zhang.** 2007. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* **73**:24-30.
144. **Yip, T. T., R. K. Ngan, W. H. Lau, Y. F. Poon, I. Joab, C. Cochet, and A. K. Cheng.** 1994. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* **74**:2414-24.
145. **Zeng, Y., R. Yi, and B. R. Cullen.** 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *Embo J* **24**:138-48.
146. **Zheng, B. J., Y. Guan, Q. Tang, C. Du, F. Y. Xie, M. L. He, K. W. Chan, K. L. Wong, E. Lader, M. C. Woodle, P. Y. Lu, B. Li, and N. Zhong.** 2004. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir Ther* **9**:365-74.



# Serment des Apothicaires

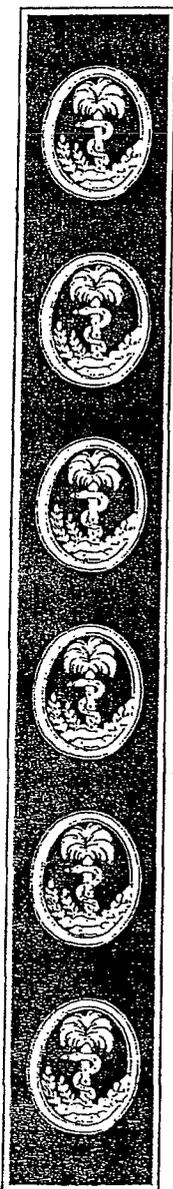
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



**BAS Ariane**

**Nouvelle stratégie thérapeutique contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr : étude *in vitro* de l'inhibition du cycle lytique du virus par ARN interférence.**

**RESUME**

Le virus d'Epstein-Barr est présent à l'état latent dans plus de 90% de la population adulte. La primo-infection est généralement asymptomatique, mais peut parfois aboutir à une mononucléose infectieuse. Le virus d'Epstein-Barr est également un cofacteur du lymphome de Burkitt endémique, du carcinome du nasopharynx et de certains syndromes lymphoprolifératifs chez l'immunodéprimé. Les protéines de latence du virus sont principalement incriminées dans la survenue de ces cancers mais le cycle lytique pourrait également avoir un rôle. Les traitements conventionnels de ces cancers ne sont pas satisfaisants.

L'ARN interférence est un processus cellulaire permettant l'inhibition de l'expression d'un gène par un mécanisme entraînant la dégradation de l'ARN messager. Nous avons utilisé cette stratégie pour inhiber une protéine produite pendant le cycle lytique du virus, la protéase.

Dans le but d'inhiber la réplication virale, nous avons dessiné quatre siRNA (small interfering RNA) dirigés contre la protéase et apprécié leur efficacité dans un modèle de cellules épithéliales EBV positives. L'utilisation d'un pool de ces quatre siRNA a permis d'obtenir une diminution de 63% de l'ARNm de la protéase, une diminution de l'expression de la protéine et une diminution de 99% de la production de virions.

Le siRNA le plus actif, siPR1, a par la suite été sélectionné et étudié plus largement. Ce siRNA a montré une activité dose dépendante avec une concentration inhibitrice 50% de 1,8 nM lorsque l'effet est évalué au niveau de l'ARN messager et de 0,09 nM lorsque celui-ci est évalué par l'infectiosité des surnageants de culture.

Ce travail est un premier pas dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine des cancers associés à l'EBV et suggère que l'ARN interférence pourrait être utilisée dans la lutte contre les infections virales.

**MOTS CLES :** ARN interférence, virus d'Epstein-Barr, protéase, cancers associés à l'EBV

**JURY** Madame le Professeur R. Grillot  
Madame le Docteur R. Germe  
Monsieur le Professeur P. Morand  
Monsieur le Docteur J.M. Crance

**DATE DE SOUTENANCE :** vendredi 23 novembre 2007

**ADRESSE DE L'AUTEUR :** [Données à caractère personnel]