

Le motif autocatalytique d'ARN du virus delta de l'hépatite humaine

Stéphane Mercure
Daniel Lafontaine
Guylaine Roy
Jean-Pierre Perreault

Le virus *delta* de l'hépatite humaine (VHD) est responsable de l'une des nombreuses formes d'hépatite virale. C'est un virus tout à fait particulier puisqu'il présente de nombreuses caractéristiques communes aux petits ARN pathogènes des plantes, telles qu'un mécanisme de réplication en cercle roulant indépendant de l'ADN, et un court génome constitué d'un ARN circulaire à forte structure secondaire. Le motif autocatalytique d'ARN retrouvé dans VHD, ou ribozyme *delta*, effectue le clivage en *cis* des brins multimériques produits lors de la réplication afin de libérer les monomères. Il peut également être manipulé de façon à effectuer le clivage en *trans* de certaines molécules d'ARN cibles. Cette dernière propriété pourrait s'avérer fort utile pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour objectif l'inhibition de la réplication d'ARN viraux ou de la traduction d'ARNm cibles.

L'hépatite *delta* constitue l'une des nombreuses formes d'hépatite virale chez l'homme. La prévalence de ce type d'hépatite est particulièrement élevée sur les continents sud-américain, africain et asiatique [1]. Elle est, en revanche, quasi absente en Amérique du Nord et sur le continent européen où on ne la trouve que dans certains groupes à risque comme les toxicomanes par voie intraveineuse. L'agent causal de cette forme d'hépatite, transmis principalement par l'intermédiaire du sang, fut identifié comme un virus possédant un génome d'ARN circulaire simple brin dont la taille atteint 1,7 kilobase [2, 3]. Ce virus, nommé virus *delta* de l'hépatite humaine ou

VHD, n'est toutefois détecté que chez des individus également infectés par le virus de l'hépatite B (VHB). Seule la co-infection ou la surinfection de ces individus par le VHD peut être à l'origine de l'hépatite *delta* qui se caractérise par une sévérité accrue des dommages hépatiques par effet cumulatif de ces deux agents infectieux [1-3]. Une telle synergie résulte du fait que le virus *delta* de l'hépatite humaine nécessite, pour son encapsidation, l'apport en *trans* de protéines codées par le génome de VHB; le VHD est ainsi considéré comme un ARN satellite. Il se distingue également des autres virus actuellement connus au sein du règne animal par l'adoption d'une structure secondaire en forme de longue tige et une

ADRESSE

S. Mercure : *stagiaire postdoctoral*. D. Lafontaine, G. Roy : *étudiants en thèse*. J.P. Perreault : *professeur adjoint, chercheur du Conseil de Recherches Médicales du Canada*. Université de Sherbrooke, Département de biochimie, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

TIRÉS À PART

J.P. Perreault.

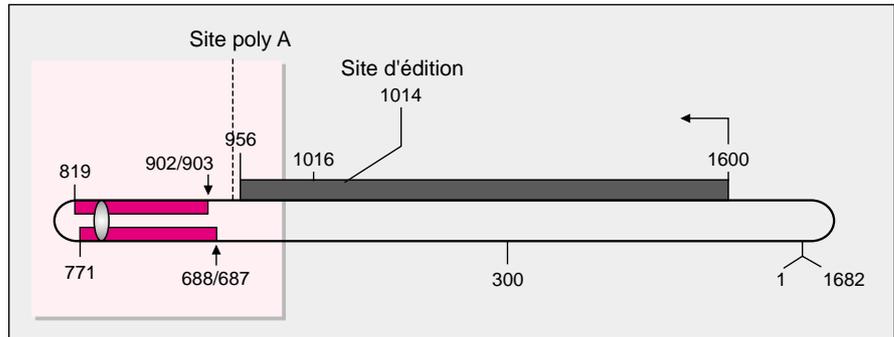


Figure 1. **Représentation schématique de la structure secondaire en tige du virus de l'hépatite δ (VHD).** Le domaine terminal de gauche est encadré. Les boîtes rouges correspondent, respectivement, aux séquences autocatalytiques génomique (position 688 à 771) et antigénomique (positions 819 à 902); les flèches indiquent les sites de clivages résultants. La boîte noire représente le cadre de lecture pour les deux formes d'antigènes résultant ou non d'un événement d'édition (editing au sens de « correction sur épreuves ») à la position 1014. Le site de réticulation aux rayons ultraviolets est représenté par un ovale. La numérotation correspond à la séquence publiée par Makino et al. [7].

RÉFÉRENCES

1. Lazinski DW, Taylor JM. Recent development in hepatitis delta virus research. *Adv Virus Res* 1994; 43: 187-231.
2. Poisson F, Roingard P, Goudeau A. Le virus de l'hépatite delta: un mode de répliation bien singulier. *Med Sci* 1995; 10: 1379-87.
3. Lai MMC. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 259-86.
4. Branch AD, Levine BJ, Robertson HD. The brotherhood of circular RNA pathogens: viroids, circular satellites and the delta agent. *Semin Virol* 1990; 1: 143-52.
5. Symons RH. The small catalytic RNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 641-71.
6. Been MD. *Cis*- and *trans*-acting ribozymes from a human pathogen hepatitis delta virus. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 251-6.
7. Makino S, Chang MF, Shieh CK, Kama-hora T, Vannier DM, Govindarajan S, Lai MMC. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta virus RNA. *Nature* 1987; 329: 343-6.
8. Polson AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature* 1996; 380: 454-6.
9. Lazinski DW, Taylor JM. Regulation of the hepatitis delta virus ribozymes: To cleave or not to cleave? *RNA* 1995; 1: 225-33.

réplication indépendante de l'ADN qui s'effectue selon un mécanisme en cercle roulant [3]. Ces caractéristiques laissent présumer que le VHD s'apparente aux viroïdes ainsi qu'aux ARN satellites de virus de plantes, pathogènes causant d'importantes pertes économiques en monoculture [4]. Tout comme dans certains viroïdes, on retrouve au sein du génome de VHD de courts domaines d'ARN, de moins de 100 nucléotides, qui sont indispensables à la répliation de son ARN. Ces domaines sont caractérisés par leur capacité d'effectuer le clivage des intermédiaires de répliation du génome par un processus dit autocatalytique. Les domaines autocatalytiques identifiés chez les viroïdes et les ARN satellites de plantes se reconnaissent à leur structure en tête de marteau (*hammerhead*) ou en épingle à cheveux (*hairpin*) [5]. Chez VHD, ce domaine est connu sous le nom de ribozyme *delta* [6]. La présente synthèse se veut un complément à un article récemment paru dans *médecine/sciences*, qui présentait un résumé des connaissances concernant la biologie moléculaire de VHD [2]. Notre objectif consiste à résumer les connaissances concernant le ribozyme *delta*, son mécanisme moléculaire et ses applications potentielles, et à faire une analyse comparative des ribozymes les plus

fréquemment mentionnés pour leur capacité d'inhiber spécifiquement des ARN impliqués dans diverses affections.

Arrangement et mode de fonction du ribozyme *delta* chez VHD

L'ARN génomique circulaire du VHD s'accumule dans les hépatocytes sous forme d'une longue structure en tige [3]. Cette structure résulte d'une complémentarité importante à l'intérieur du génome de VHD qui peut alors être séparé en deux domaines distincts (*figure 1*): le domaine de droite, qui est codant et le domaine terminal de gauche (~360 nucléotides), qui s'apparente fortement aux viroïdes (*figure 1*, portion encadrée de la séquence qui correspond aux nucléotides 620-980). Le domaine de droite comporte la majorité du cadre de lecture pour l'antigène *delta*, qui est traduit à partir de la séquence antigénomique. Cet antigène se présente sous deux formes, l'une de 195 acides aminés et l'autre de 214 acides aminés (*figure 1*) [2]. La forme allongée résulte d'un événement d'édition, qui a lieu à proximité du domaine terminal de gauche sur la copie génomique. De récents résultats démontrent qu'une désadénylation transforme le codon de terminaison du cadre de lecture

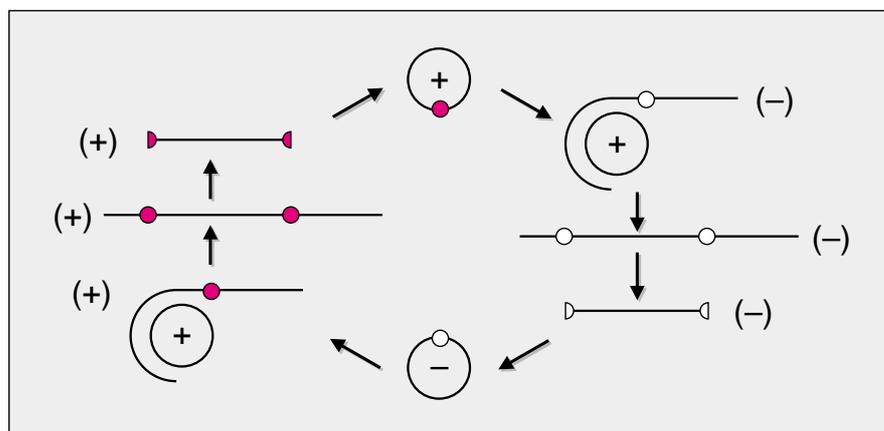


Figure 2. **Représentation du cycle de réplication en cercle roulant du VHD.** Les cercles rouges et blancs indiquent les sites d'autocoupure, respectivement des brins génomiques et antigénomiques. Les polarités génomique et antigénomique sont représentées respectivement par les symboles (+) et (-).

RÉFÉRENCES

10. Sharmeen L, Kuo MYP, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. The antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol* 1988; 62: 2674-9.

11. Lazinski DW, Taylor JM. Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J Virol* 1995; 69: 1190-200.

12. Sharmeen L, Kuo MYP, Taylor J. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol* 1989; 63: 1428-30.

13. Smith JB, Gottlieb PA, Dinter-Gottlieb G. A sequence element necessary for self-cleavage of the antigenomic hepatitis delta RNA in 20M formamide. *Biochemistry* 1992; 31: 9629-35.

14. Branch AD, Robertson HD. Efficient *trans* cleavage and a common structural motif for the ribozymes of the human hepatitis delta agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10163-7.

15. Tanner NK, Schaf S, Thill G, Petit-Koskas E, Crain-Denoyelle AM, Westhof E. A three-dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analyses. *Curr Biol* 1994; 4: 488-98.

16. Been MD, Perrotta AT. Optimal self-cleavage activity of the hepatitis delta virus RNA is dependent on a homopurine base pair in the ribozyme core. *RNA* 1995; 1: 1061-70.

de la forme courte, en un codon tryptophane [8]. Le prochain codon de terminaison est alors reconnu comme signal d'arrêt de la traduction. La forme de 195 acides aminés est, entre autres, nécessaire pour permettre le début de la réplication tandis que la forme de 214 acides aminés favorise les étapes suivantes d'assemblage de la capside aux dépens de celles de réplication [3].

Le domaine terminal gauche porte, quant à lui, tous les éléments nécessaires à l'exécution de la réplication en cercle roulant. Le cycle de réplication du VHD est mis en route par la polymérase II de l'hôte, qui synthétise un brin multimérique antigénomique [2, 9]. Ce nouveau brin est coupé en copies monomériques qui sont liées pour produire des copies circulaires antigénomiques. Par la suite, ces dernières molécules d'ARN servent de matrices pour la production de la progéniture circulaire génomique, qui s'effectue selon les trois mêmes étapes de synthèse, clivage et ligation (figure 2). Le clivage des intermédiaires de réplication est accompli par deux domaines autocatalytiques distincts qui ont respectivement le rôle de couper les brins génomiques et antigénomiques.

Les similitudes structurales observées entre le domaine terminal de gauche et les viroïdes sont à l'origine de la mise en évidence de l'activité autocatalytique chez VHD. En effet, l'identification d'une activité autocatalytique chez certains viroïdes conduisit à

rechercher un phénomène similaire chez VHD. L'analyse de fragments d'ARN d'origine génomique et antigénomique, à pH et température physiologiques en présence de l'ion magnésium, révéla la présence d'un site d'autocoupure spécifique sur chacun de ces brins [10]. Un fragment minimal conservant l'activité d'autocoupure fut par la suite identifié pour chacun des brins [6, 9]. Cette caractérisation révéla que la séquence minimale est, dans les deux cas, presque entièrement constituée de nucléotides situés du côté 3' par rapport au site de coupure (figure 3). Bien que la séquence primaire de ces domaines catalytiques soit relativement différente, les structures secondaires prédites s'avèrent presque identiques d'où l'appellation commune, «ribozyme delta», pour ces deux entités. Par suite de l'appariement partiel créant la structure en tige, les domaines autocatalytiques génomique et antigénomique se retrouvent directement opposés l'un à l'autre (figure 1). Les sites de clivage sont situés, respectivement, entre les nucléotides 687/688 et 902/903 pour les brins génomique et antigénomique (figure 1).

L'autoclivage consiste en une réaction de transestérification qui engendre des extrémités 2',3'-phosphocyclique et 5'-hydroxyle. Ces extrémités sont juxtaposées lors de la formation de la structure en tige des monomères circulaires. Les résultats de récentes expériences réalisées *in*

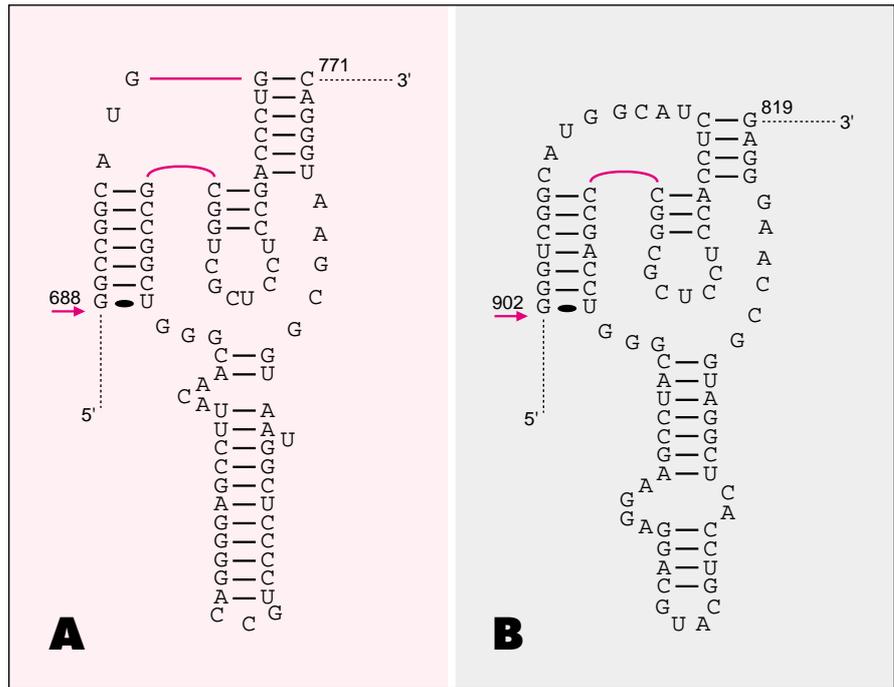


Figure 3. **Représentation schématique des motifs autocatalytiques d'ARN du VHD (réactions en cis).** Séquences nucléotidiques et structures secondaires des motifs autocatalytiques génomique (A) et antigénomique (B) selon le modèle de pseudo-nœud. Les sites de clivage sont identifiés par une flèche. La numérotation correspond à la séquence publiée par Makino et al. [7].

RÉFÉRENCES

17. Suh YA, Kumar PKR, Kawakami J, Nishikawa F, Taira K, Nishikawa S. Systematic substitution of individual bases in two important single-stranded regions of the HDV ribozyme for evaluation of the role of specific bases. *FEBS Lett* 1993; 326: 158-62.
18. Kawakami J, Kumar PKR, Suh YA, Nishikawa F, Kawakami K, Taira K, Ohtsuka E, Nishikawa S. Identification of important bases in a single-stranded region (SSrC) of the hepatitis delta (δ) virus ribozyme. *Eur J Biochem* 1993; 217: 29-36.
19. Branch AD, Polaskova JA. 3-D models of the antigenomic ribozyme of the hepatitis delta agent with eight new contacts suggested by sequence analysis of 188 cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4180-9.
20. Perrotta AT, Been MD. Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1314-21.
21. Bravo C, Lescure F, Laugãa P, Fourrey JL, Favre A. Folding of the HDV antigenomic ribozyme pseudoknot structure deduced from long-range photocrosslinks. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1351-9.
22. Kumar PKR, Taira K, Nishikawa S. Chemical probing studies of variants of the genomic hepatitis delta virus ribozyme by primer extension analysis. *Biochemistry* 1994; 33: 583-92.

in vivo suggèrent que le mécanisme naturel de ligation des monomères est le fruit d'une catalyse impliquant une enzyme de l'hôte [11]. *In vitro*, il demeure cependant possible d'induire une ligation non enzymatique de ces extrémités, en l'absence de protéines [12]. De manière plus générale, il est proposé que des protéines accessoires (*helper*) pourraient être impliquées tant lors de la synthèse des brins que de l'autoclivage et de la ligation [9, 11].

L'adoption de la structure en tige par les monomères est également un élément important pour assurer la stabilité et l'intégrité du VHD. L'hybridation des séquences complémentaires aux dépens de la structure catalytique, moins stable en terme d'énergie libre [9], prévient l'auto-coupage des copies filles ce qui diminue la susceptibilité potentielle de celles-ci à être dégradées par les ribonucléases intracellulaires. On a également étudié l'impact sur l'activité autocatalytique, d'appariements créant des structures secondaires alternatives adjacentes au ribozyme

delta [6, 9]. Ainsi, on démontra qu'une réduction de la longueur d'un fragment d'ARN portant le ribozyme *delta* pouvait s'accompagner d'une augmentation de l'activité de clivage et ce, jusqu'à obtenir une séquence minimale catalytiquement active. L'explication en est que l'on favorise graduellement la structure qui possède les propriétés catalytiques aux dépens de la structure en tige normalement plus stable. Ce phénomène explique également pourquoi l'autoclivage des fragments d'ARN relativement longs, dérivés des régions autocatalytiques du VHD, est stimulé par de fortes concentrations d'agents dénaturants tels l'urée et la formamide [13].

Éléments essentiels du ribozyme *delta*

Lors de la réplication du VHD, le mécanisme de clivage des brins génomiques et antigénomiques est dit autocatalytique puisque la réaction a lieu en *cis* et une seule fois. Toutefois, il a été possible de diviser le brin

RÉFÉRENCES

23. Lee CB, Lai YC, Ping YH, Huang ZS, Lin JY, Wu HN. The importance of the helix 2 region for the cis-cleaving and trans-cleaving activities of hepatitis delta virus ribozymes. *Biochemistry* 1996; 35: 12303-12.
24. Altman S. RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10898-900.
25. Hélène C, Saison-Behmoaras E. La stratégie anti-sens: nouvelles approches thérapeutiques. *Med Sci* 1994; 10: 253-73.
26. Perreault JP, Altman S. La ribonucléase P: une véritable enzyme à ARN *in vitro*. *Med Sci* 1991; 7: 847-50.
27. Li Y, Altman S. Cleavage by RNase P of gene N mRNA reduces bacteriophage λ burst size. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 835-42.
28. Herschlag D. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6921-5.
29. Ohkawa J, Koguma T, Kohda T, Taira K. Ribozymes: from mechanistic studies to applications *in vivo*. *J Biochem* 1995; 118: 251-8.
30. Chowrira BM, Pavco PA, McSwiggen JA. *In vitro* and *in vivo* comparison of hammerhead, hairpin, and hepatitis delta virus self-processing ribozyme cassettes. *J Biol Chem* 1994; 269: 25856-64.
31. Xing Z, Mahadeviah S, Whitton JL. Antiviral activity of RNA molecules containing self-releasing ribozymes targeted to lymphocytic choriomeningitis virus. *Antisense Res Dev* 1995; 5: 203-12.
32. Polo JM, Lim B, Govindarajan S, Lai MMC. Replication of hepatitis delta virus RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *J Virol* 1995; 69: 5203-7.

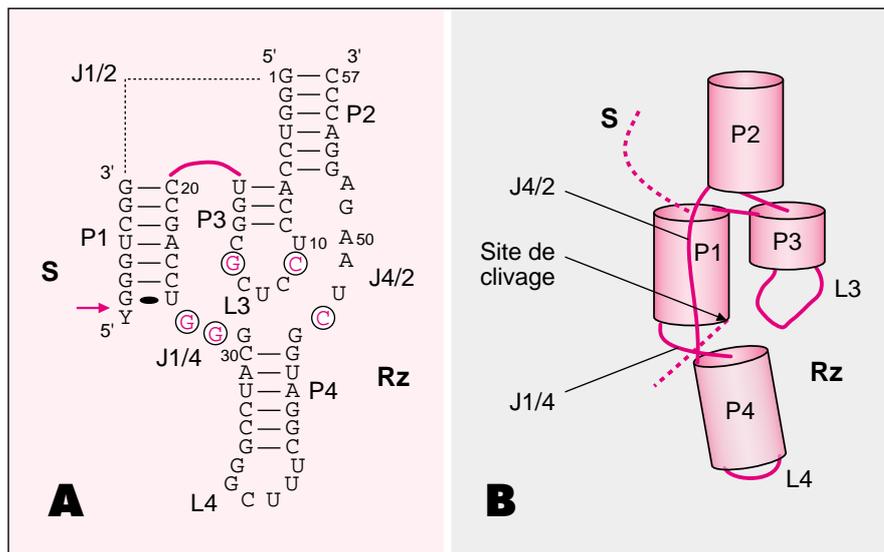


Figure 4. **Représentations schématiques de la structure secondaire et d'un modèle de structure tridimensionnelle du ribozyme delta.** **A.** Structure secondaire du complexe ribozyme-substrat (**Rz-S**) de la construction que nous utilisons couramment, dérivée de la séquence antigénomique. La flèche indique le site de coupure. Un Y identifie la pyrimidine adjacente au site de clivage. Les nucléotides identifiés comme ayant une influence sur l'efficacité de clivage du ribozyme sont encadrés. La ligne pointillée délimite la portion facultative qui peut être éliminée lors de la construction de ribozyme agissant *in trans*. **B.** Modèle de la structure tertiaire du complexe ribozyme-substrat. Les hélices sont illustrées par des barils tandis que les régions en simple brin sont par un ruban en gras. Le ruban gras interrompu correspond au substrat.

d'ARN en deux domaines et de développer une réaction *in trans* dans laquelle une molécule, identifiée comme un ribozyme, possède les propriétés catalytiques nécessaires au clivage successif de plusieurs molécules de substrats (figure 4A) [6, 14]. La spécificité et l'association du complexe ribozyme-substrat sont assurées par la formation d'une hélice double brin entre ces deux entités. La subdivision des domaines ribozyme et substrat s'effectue en séparant le fragment initial d'ARN à plusieurs endroits tout en respectant la structure secondaire catalytique minimale. La façon usuelle de séparer le ribozyme du substrat consiste à scinder le brin d'ARN à l'extrémité 3' de l'hélice où se produit le clivage (figure 4A). Pour des raisons encore inconnues, la catalyse par le brin génomique du ribozyme *delta* est moins efficace que par celle du brin antigénomique [5, 8]. Par conséquent, ce dernier est généralement utilisé comme ribozyme. Le développement de système *in trans* a permis d'importants progrès dans la compréhension du mécanisme molé-

culaire de cette catalyse. Ainsi, de nombreux essais de corrélation entre structure et fonction à l'aide d'ARN produits par transcription *in vitro*, à partir de matrices d'ADN modifiées par mutagenèse dirigée, ont permis de décrire la structure secondaire catalytique ainsi que d'identifier certains éléments essentiels au clivage. Nous nous contenterons ci-dessous de dresser un portrait des connaissances actuelles concernant le ribozyme *delta*.

La structure secondaire du ribozyme *delta* se résume à quatre hélices identifiées de P1 à P4, deux boucles internes, L3 et L4, et trois jonctions simples brin nommées J1/2, J1/4 et J4/2 selon les hélices qu'elles réunissent (figure 4A). Une brève description de l'importance de chacun de ces éléments pour la catalyse est présenté ci-dessous (voir aussi [6, 15]).

• **Nature et composition des hélices.** L'hélice P1 lie le ribozyme au substrat. Elle est constituée de 7 paires de bases (pb) \pm 1. Cette hélice est adjacente au site de clivage. Sa com-

position en nucléotides a peu d'impact sur l'efficacité de la catalyse. Néanmoins, plus elle est riche en résidus G et C, plus la liaison ribozyme-substrat est efficace. L'hélice P3 est composée de seulement 3 pb. La longueur de P3 est cruciale, suggérant qu'elle positionne la boucle L3 par rapport au site de clivage. La nature des nucléotides composant P3 n'est pas primordiale pour l'efficacité de la catalyse, mais il y a une nette préférence pour les paires de bases GC. Comme l'hélice est très courte, la stabilité conférée par les paires de bases GC pourrait être requise pour sa formation. L'hélice P4 est un élément structural contribuant au bon assemblage et à la stabilité du corps catalytique. Cependant, l'hélice P4 ainsi que la boucle L4 peuvent être enlevées et remplacées par une courte séquence d'espacement de 3 nucléotides sans effet négatif majeur sur l'efficacité de la réaction. L'épingle à cheveux formée par l'hélice P4 et la boucle L4 est d'ailleurs caractérisée par un grand nombre de variants naturels de séquence. Finalement, l'hélice P4 est invariablement précédée d'une paire de bases non traditionnelle GG nécessaire pour une catalyse efficace [16]. Lors de sa formation, un tel appariement non Watson-Crick induit une distorsion dont l'impact sur la structure tertiaire et le mécanisme moléculaire du ribozyme *delta* demeure inconnu. Pour sa part, l'hélice P2 est le résultat d'une complémentarité entre des bases de la jonction J1/2 et d'autres bases situées en aval de l'hélice P4 (*figure 4A*). Un tel appariement, connu sous le nom de pseudo-nœud, est essentiel à la structure secondaire de ce ribozyme puisqu'il permet de positionner la jonction J4/2 au sein de la structure tertiaire. La composition en nucléotides de cette hélice n'a cependant que peu d'effet sur le niveau de clivage.

• **Les régions en simple brin.** Certaines de ces régions sont accessoires tandis que d'autres comptent des nucléotides essentiels à la catalyse. Au niveau du substrat une pyrimidine doit être adjacente en 5' au site de clivage (*figure 4A*). La boucle L4 et la jonction J1/2 sont des éléments accessoires associés à la réaction

autocatalytique. Généralement, elles sont absentes des modèles d'études en *trans*. Les trois autres régions en simple brin, L3, J1/4 et J4/2 sont importantes. Des expériences de sélection *in vitro* d'ARN présentant une caractéristique spécifique à partir d'un répertoire de séquences aléatoires (SELEX) (dans ce cas pour une efficacité élevée d'autocoupeure) ainsi que des études par mutagenèse dirigée ont révélé l'identité des nucléotides essentiels à la catalyse à l'intérieur de ces régions [9, 15, 17-20]. La boucle L3 comporte 7 ou 8 nucléotides dont le C₁₁ et le G₁₅ qui sont essentiels à l'activité catalytique. Au niveau de la jonction J4/2, le C₄₇ est crucial pour que le mécanisme de clivage s'effectue. Finalement, la jonction J1/4 comporte deux G (positions 27 et 28) importants pour l'activité catalytique (*figure 4A*); cependant, leurs rôles demeurent inconnus.

Modélisation de la structure tridimensionnelle

Au cours des dernières années, de nombreux efforts ont été faits pour résoudre l'énigme que constitue la structure tridimensionnelle du ribozyme *delta*, cruciale si l'on veut comprendre cette macromolécule. Des études d'interférences chimiques et de réticulation aux rayons ultraviolets (avec des agents photoactivables situés à différentes positions du substrat; [21]) ainsi que la modélisation assistée par ordinateur, ont permis d'obtenir des données préliminaires sur la structure tertiaire de ce ribozyme [15, 19, 22]. La *figure 4B* illustre un modèle simplifié du complexe ribozyme-substrat dans lequel les hélices sont représentées par des barils. Brièvement, les hélices P1 et P3 sont parallèles et, avec la boucle L3, délimitent le centre catalytique du ribozyme, qui se trouve stabilisé par les hélices P2 et P4 localisées de part et d'autre de la structure. La partie du substrat impliquée dans l'hélice P1 se retrouve à l'intérieur du centre catalytique, ce qui permet l'action au site de clivage (voir la flèche, *figure 4B*). Une telle localisation pourrait aussi expliquer pourquoi le relargage du produit peut, dans certains cas, être limitant [23]. Par ailleurs, les nucléotides des

régions en simple brin mentionnés comme essentiels à la catalyse se retrouvent tous dans le même environnement; soit les G₂₇ et G₂₈ de la jonction J1/4, le C₄₇ de la jonction J4/2 et le C₁₁ ainsi que le G₁₅ de la boucle L3. Une étude d'interférences chimiques apporte un soutien de plus à ce modèle puisqu'elle a permis de démontrer que, sauf exception du C₄₇, tous ces nucléotides sont protégés en présence de magnésium [22]. Le ribozyme *delta* est une métalloenzyme à ARN qui utilise comme cofacteur le calcium aussi efficacement que le magnésium [6]. Cette propriété lui est propre et le différencie de tous les autres ARN catalytiques connus. Cependant, tout comme l'enzymologie de cette catalyse, le pourquoi et les conséquences découlant de cette propriété demeurent inconnus. En effet, les paramètres cinétiques du clivage accompli par le ribozyme *delta* demeurent encore à ce jour largement méconnus, que le cofacteur utilisé soit le magnésium ou le calcium. Les travaux actuels de nombreuses équipes intéressées à mieux comprendre le mécanisme moléculaire du ribozyme *delta* par biochimie, résonance magnétique ou cristallographie, contribueront à mieux visualiser et à comprendre ce ribozyme unique en son genre.

Recherche et développement de l'application du ribozyme *delta*

Les ribozymes peuvent être considérés comme des agents thérapeutiques prometteurs pour moduler des ARN donnés dans le contexte cellulaire (*figure 5*) [24]. Par exemple, ils pourraient cibler puis cliver des ARN viraux de façon à prévenir la réplication ultérieure de ces pathogènes, ou encore moduler le produit de l'expression de gènes tels les oncogènes impliqués dans différents cancers humains. Par comparaison avec la technologie des ARN antisens [25], les ribozymes offrent trois avantages [24]: (1) ils modifient les ARN cibles et ne se limitent pas à inhiber ou à ralentir la maturation ou la traduction d'un ARN messager; (2) ils adoptent une structure tertiaire très organisée, ce qui leur confère une stabilité accrue en milieu cellulaire; et (3) ils possèdent, lorsque le relargage des produits est nonlimitant, une activité

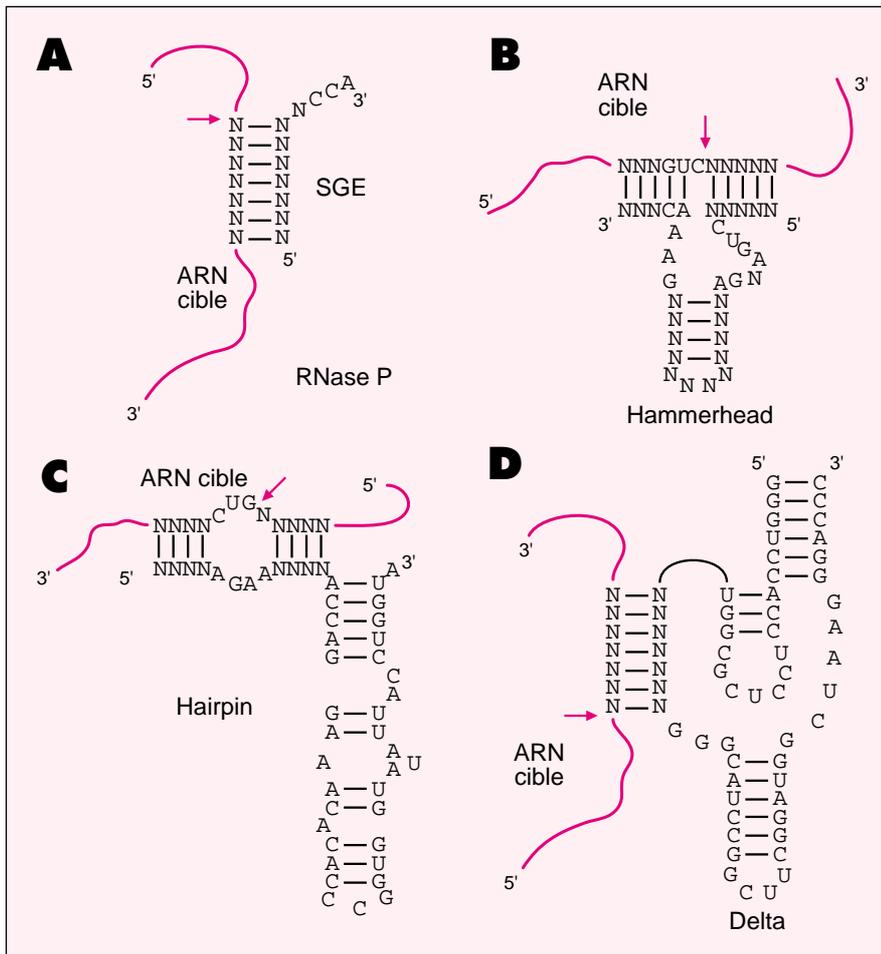


Figure 5. **Représentation schématique de différents ribozymes ciblant des substrats d'ARN non naturels.** A. La RNase P et sa séquence guide externe (SGE); B. le ribozyme hammerhead (en tête de marteau); C. Le ribozyme hairpin (en épingle à cheveux); et D. Le ribozyme delta. Les ARN cibles sont représentés par une ligne dont seulement les nucléotides impliqués dans la reconnaissance ribozyme-substrat sont identifiés. Seule l'identité des nucléotides absolument requis est présentée. N représente un nucléotide quelconque (A, G, C ou U) ayant la capacité de former ou non une paire de base Watson-Crick. Les sites de clivage sont pointés par des flèches. À l'exception du ribozyme delta, les trois autres modèles comportent uniquement les nucléotides extrêmement conservés. Concernant le ribozyme delta, un appariement instable G-U à l'extrémité 5' de l'hélice P1 pourrait s'avérer nécessaire à la catalyse. En raison de l'incertitude qui entoure la présence de cet appariement, celui-ci a été volontairement omis.

moléculaire spécifique (*turnover*) leur permettant de modifier successivement plusieurs molécules de substrats, ce qui est, sans aucun doute, leur avantage le plus important. Les ribozymes peuvent être appliqués selon deux modes [24]. D'une part, ils peuvent être synthétisés par voie chimique ou enzymatique et être intégrés à différents véhicules de façon à être livrés de manière exogène à des cellules cibles. Ce mode permet d'introduire des nucléotides

analogues pour augmenter la stabilité (ex.: désoxyribonucléotides, etc.) des molécules contre les nucléases cellulaires. D'autre part, les ribozymes peuvent être synthétisés de manière endogène par l'utilisation de vecteurs d'expression, ce qui assure une production continue de l'agent thérapeutique dans la cellule cible. Bien que tous les ribozymes possèdent *a priori* un potentiel important pour inactiver des ARN cibles, jusqu'à ce jour, seules les séquences

catalytiques *delta*, *hammerhead* (en tête de marteau), *hairpin* (en épingle à cheveux) et la ribonucléase P (RNase P) ont fait l'objet d'essais préliminaires *in vivo*. La RNase P est une enzyme vitale qui catalyse le clivage endonucléotidique à l'extrémité 5' des ARN de transfert [26]. Cette enzyme est composée d'une sous-unité ARN et d'au moins une sous-unité protéique. Chez les eubactéries, telle *Escherichia coli*, la sous-unité ARN possède les propriétés catalytiques et est le seul vrai ribozyme naturel décrit à ce jour (c'est-à-dire capable de catalyser une réaction *in trans*). L'observation qu'une seule RNase P était responsable de la maturation de tous les précurseurs d'ARN de transfert d'une cellule suggérait que cette enzyme ne reconnaissait pas une séquence mais plutôt une structure. Cette dernière fut identifiée et consiste en une hélice flanquée d'une séquence précurseur en 5' et d'une séquence NCCA en 3' (figure 5A). La séquence possédant le NCCA constitue une séquence guide externe, qui peut cibler successivement plusieurs molécules de substrat [26]. Pour une application potentielle, ce ribozyme devrait cibler n'importe quelle séquence d'ARN, pour autant que celle-ci soit accessible et que la séquence guide externe désirée soit fournie. Comme la RNase P est un constituant naturel des cellules procaryotes et eucaryotes, son utilisation pour le développement d'une thérapie anti-ARN reçoit beaucoup d'attention [27]. Trois autres ribozymes isolés de différentes sources offrent des possibilités thérapeutiques intéressantes. Le ribozyme *hammerhead* (figure 5B) retrouvé chez des viroïdes et des ARN apparentés, le ribozyme *hairpin* (figure 5C) retrouvé uniquement chez des ARN satellites de virus de plantes [4] et le ribozyme *delta* retrouvé chez le virus humain de l'hépatite *delta*. Le principe d'utilisation de ces ribozymes est fondé sur l'observation que leur domaine structural, qui est responsable de l'activité d'autoclivage, est séparable en deux entités pouvant être chacune représentée par un oligonucléotide [24]. Ainsi, un premier oligonucléotide peut posséder les propriétés catalytiques, tandis que le second correspondra au substrat et présentera le site potentiel de clivage

(figure 5B-D). Ces deux oligonucléotides doivent s'associer par l'intermédiaire d'une (*delta*) ou deux hélices (*hammerhead*, *hairpin*) pour que le clivage soit réalisé. La séquence du substrat étant connue (ARN cible), la séquence complémentaire permettant l'hybridation du ribozyme définit la reconnaissance. Il y a un minimum de contraintes à respecter, telle que la séquence GUC adjacente au site de coupure d'un substrat pour le ribozyme *hammerhead* (figure 5B). Parmi ces trois modèles, le ribozyme *delta* est le moins contraignant puisqu'il ne nécessite, au niveau du substrat, qu'une pyrimidine adjacente au site de clivage (figure 5D). Le court domaine de reconnaissance de 7 +/- 1 pb de l'hélice P1 du ribozyme *delta* peut être considéré comme une limite d'utilisation, car moins discriminatif comparé aux deux hélices des ribozymes *hammerhead* et *hairpin* (généralement composées de ~ 5 +/- 1 pb chacune). Une analyse théorique tenant compte du pouvoir de discrimination de la cible, de l'efficacité de l'appariement et de la vitesse de relargage des produits de clivage a permis d'établir que 7 pb est la longueur optimale pour une séquence antisens [28]. Les séquences plus courtes limitent le pouvoir de discrimination et sont moins efficaces pour la formation du complexe ribozyme-substrat, tandis que les séquences plus longues peuvent limiter l'étape de libération des produits entraînant une diminution non souhaitable de l'activité moléculaire spécifique des ribozymes. De plus, de longues séquences de reconnaissance peuvent réduire le pouvoir de discrimination en permettant des appariements partiels avec d'autres séquences que la cible, ce qui peut entraîner le clivage d'ARN non ciblés et/ou la réduction de la quantité de ribozyme actif car une portion est engagée dans un complexe ribozyme-substrat non productif.

Les ribozymes *hammerhead* et *hairpin* offrent les avantages d'être courts et de présenter des mécanismes moléculaires relativement bien établis [5]. Ce sont ces ribozymes qui ont reçu le plus d'attention pour le développement de thérapies anti-ARN. Par exemple, ils ont été utilisés *in vivo* pour cibler le génome du VIH ainsi que plusieurs transcrits qui en sont

dérivés [24, 29]. Malgré notre compréhension toujours imparfaite de son mécanisme moléculaire, le ribozyme *delta* se compare avantageusement aux ribozymes précédents. En effet, ce ribozyme possède des caractéristiques qui lui sont propres et qui pourraient s'avérer d'importance lors du développement de traitements par des ARN catalytiques: (1) le ribozyme *delta* présente la capacité naturelle d'être fonctionnel dans un contexte de protéines nucléaires humaines; (2) sa région de reconnaissance de la séquence cible impose un minimum de restriction et est optimale en terme de longueur (voir ci-dessus); (3) il utilise aussi efficacement le calcium que le magnésium comme co-facteur; et, (4) il est fonctionnel à la concentration de magnésium libre intracellulaire (1mM). Jusqu'à maintenant l'application du ribozyme *delta* a été relativement limitée [30, 31]. Par exemple, la transfection transitoire de cellule de souris, par un vecteur plasmidique portant la séquence du ribozyme *delta*, a permis de démontrer la capacité de ce ribozyme de produire l'autoclivage dans un milieu cellulaire hétérologue [30]. L'intérêt médical associé au VHD ne se limite cependant pas à son potentiel anti-ARN. Le VHD offre pour alternative intéressante son utilisation comme vecteur d'expression après élimination des séquences de pathogénicité. Le VHD pourrait ainsi être appelé à transporter et relarguer dans les hépatocytes des ribozymes qui, par leur spécificité, auraient le potentiel d'inhiber la réplication de VHD ou VHB lors d'infections chroniques [1]. Le potentiel de VHD comme vecteur d'expression est, d'ailleurs, beaucoup plus important qu'on ne l'a cru au premier abord, puisque plusieurs types de cellules non hépatiques permettent sa réplication [32].

La découverte surprenante des ARN catalytiques constitue une démonstration classique du lien qui existe entre la recherche et le développement. Bien que le potentiel thérapeutique des ribozymes demeure à ce jour inexploité, différents travaux suggèrent que ces ARN catalytiques pourraient constituer des outils cliniques dans un futur plus ou moins rapproché. Il est encore trop tôt pour affirmer lequel des ribozymes présentés ci-dessus, ou encore un ribozyme toujours

inconnu, parviendra à franchir les différentes étapes menant à sa validation et à son approbation comme agent thérapeutique. Toutefois, les caractéristiques particulières du VHD font de ce dernier un candidat de choix puisqu'il peut s'avérer aussi utile comme vecteur que comme agent anti-ARN. De façon à exploiter pleinement le potentiel du VHD et des autres ARN autocatalytiques, une collaboration étroite devra être établie entre les équipes de recherche et de développement pour parfaire nos connaissances concernant le mécanisme moléculaire des ribozymes ainsi que leur mode de transfert et d'expression *in vivo* ■

Remerciements

Nos travaux de recherche sont subventionnés par le Conseil de Recherches Médicales (CRM, Canada), le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG, Canada) et le Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Fonds FCAR, Québec). G.R. et D.L. ont des bourses prédoctorales respectivement du CRSNG et du FRSQ-FCAR. J.P.P. est un chercheur boursier du CRM.

Summary

The self-catalytic RNA motifs of the hepatitis *delta* virus

The hepatitis *delta* virus (HDV) is responsible for a common form of viral hepatitis. This virus is unique among human pathogens and shares several characteristics with plant viroids, such as their DNA-independent rolling circle replication mechanism and a highly folded small circular RNA genome. The present review will focus on the structures, the molecular mechanism and the applications of the *delta* ribozyme which is the self-catalytic motif found in HDV. This motif performs the *cis* cleavage of the multimeric strands in monomers during HDV replication. The *delta* ribozyme may also be modified so cleavage of a target RNA is achieved in *trans*. This last property might be helpful in the development of therapeutic applications aimed at inhibiting replication of viral RNA or translation of target mRNA.