

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**TRANSFERT D'UN GENE RAPPORTEUR
INDUCTIBLE A L'AIDE D'ADENO-ASSOCIATED
VIRUSES (AAV) RECOMBINANTS DANS LE MUSCLE
DE PRIMATE : AVANCEES ET LIMITES ACTUELLES**

THESE DE DOCTORAT

**Ecole doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Médecine
Spécialité : Virologie**

*présentée
et soutenue publiquement par*

CHENUAUD Pierre

le 26 Octobre 2004, devant le jury ci-dessous

**Président du jury :
Rapporteurs :**

*Pr. Sylviane Billaudel
Pr. Yves Beuzard
Dr. Jean Davoust*

**Examinatrice :
Directeur de thèse :**

*Dr. Hélène Gilgenkrantz
Dr. Philippe Moullier*

Remerciements

A mes parents,
à Philippe, à Laure,
à Sébastien et Cédric,
à toute ma famille.

Je remercie Philippe Moullier, directeur de l'Unité Inserm 649, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir encadré tout au long de cette thèse.

Je remercie David Favre pour m'avoir encadré lors de mes débuts au laboratoire.

Je remercie Nathalie Provost pour son encadrement technique et ses conseils.

Je remercie sincèrement Madame Sylviane Billaudel, Monsieur Jean Davoust, Monsieur Yves Beuzard et Madame Hélène Gilgenkrantz pour avoir accepté d'être membres de mon jury.

Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai travaillé directement ou collaboré : Thibaut Larcher, Yves Cariou, Sébastien Küry, Yan Cherel, Guillaume Podevin, Frédéric Ebstein, Nicole Casadevall, Joelle Nataf, Magalie Herry, Patrick Mayeux, Françoise Lasne, pour leur aide indispensable, leur disponibilité, leurs conseils et leur intérêt pour le sujet.

Merci à Anita Champion, secrétaire du laboratoire.

Je remercie également Nicolas Ferry et Fabienne Rolling pour leur expérience concernant les vecteurs et le transfert de gène *in vivo*.

Merci également...

A Magalie, Yan, Delphine, Matthieu, Rafi, Claire, Véronique, Eric, Knut, Matthew pour tous les moments partagés au laboratoire ou en dehors. Que de souvenirs, que de souvenirs...

A Estelle, Marie-Claude, Mickaël, Achille, Gilliane, Olivier, Guylène, Sylvain, Alice, Caroline, Aurélie, Alexandra, Nicole, Cécile, Isabelle, Sandy, Frédéric, Karine et toute l'équipe du LAV pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Au personnel du Centre de Boisbonne pour leur aide précieuse et leur savoir-faire. Remerciements particuliers à Margot, Béatrice, Sonia, Luc, Rémy, David et Anthony.

A Christophe, boss du LAV et docteur ès squash.

A Sylvie pour les longueurs de piscine et les bulles en tous genres.

A Carine, ma voisine de paillasse préférée.

A Arnaud et David pour le swell, le vent et les petites routes de campagne.

A Gwen et Céline pour la photo, la musique et la cuisine maison.

A Antoine, Eli, Cyrille, Fred, Eve, Benoît, Rozenn, Olivier pour tous les moments partagés depuis des années.

Et un grand pardon aux personnes que j'aurais pu oublier...

Abréviations

AAV : *adeno-associated virus*

AAVr : *recombinant adeno-associated virus*

Ad : adénovirus

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messenger

BMD : Dystrophie musculaire de Becker

CAG : promoteur chimère de la β -actine de poulet fusionné à l'enhancer du promoteur précoce du Cytomégalo virus

CD : cellule dendritique

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

cm : macaque *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*)

cmEpo : érythropoïétine de macaque *cynomolgus*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalo virus

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CsCl : chlorure de césium

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

Des : promoteur de la desmine humaine

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

Dox : doxycycline

Epo : érythropoïétine

FGF-R: *Fibroblast Growth Factor Receptor*

FIV: *Feline Immunodeficiency Virus*

FIX : facteur IX de la coagulation

GFP : *green fluorescent protein*

gsg : γ -sarcoglycan

haAT : alpha-antitrypsine humaine

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSPG: *Heparan Sulfate Proteoglycan*

HSV : Herpes Simplex virus

Ht : hématocrite

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

IM : intramusculaire

ITR : *inverted terminal repeat*

IV : intraveineux

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

LacZ: gène de la β -galactosidase d'E. coli

Mb : mégabase

MCK : *Muscle Creatine Kinase*

mdx (souris) : modèle murin de la myopathie de Duchenne

mEpo : érythropoïétine murine

MOI : multiplicité d'infection

MuMoLV : Murine Moloney leukemia virus

nls : *nuclear localization signal*

p.i : particules infectieuses

p.t : particules totales

pA : signal de polyadénylation

pb : paire de base

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor*

RBE : *Rep Binding Element*

RBS : *Rep Binding Site*

RCA : Replication Center Assay

RT-PCR : *Reverse Transcriptase PCR*

rtTA : *reverse tetracycline controlled transactivator*

SIV: *Simian Immunodeficiency Virus*

TCR : Récepteur des lymphocytes T

Tet: tétracycline

Tet-Off : système de répression de la transcription contrôlé par la doxycycline

Tet-On : système d'activation de la transcription contrôlé par la doxycycline

trs : *terminal resolution site*

tTA : *tetracycline controlled transactivator*

tTS : *tetracycline controlled transcriptional silencer*

v.g : *vector genome*

WPRE : *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*

Illustrations

Figure 1 :	Vecteurs utilisés en transfert de gène et essais cliniques	5
Figure 2 :	Organisation génomique de l'AAV-2 sauvage	10
Figure 3 :	Structure de la capside de l'AAV-2	13
Figure 4 :	Structure de la capside de l'AAV-5	15
Figure 5 :	Cycle viral de l'AAV	17
Figure 6 :	Modèles d'intégration du génome AAV sauvage au niveau du site AAVS1	21
Figure 7 :	Schéma général de réplication de l'AAV-2	23
Figure 8 :	Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr)	26
Figure 9 :	Production de vecteurs AAVr	29
Figure 10 :	Production de vecteurs pseudotypés de sérotypes 1 à 5	32
Figure 11 :	Interaction de la capside d'AAV-2 avec l'héparine	37
Figure 12 :	Entrée et trafic intracellulaire de l'AAV	41
Figure 13 :	Modèle de la formation du second brin de l'AAVr par appariement des génomes simple brin de polarité opposée	49
Figure 14 :	Système Tet-On	91
Figure 15 :	Biopsies musculaires des macaques 15 et 16 - Résultats complémentaires (1) -	119
Figure 16 :	Suivi des paramètres hématologiques et de la réponse humorale contre l'Epo chez Mac 10 et 14 - Résultats complémentaires (2) -	128

Sommaire

Préambule	1
1. Introduction	3
1.1 La thérapie génique.....	3
1.2 L'Adeno-Associated Virus.....	6
1.2.1 Généralités sur le virus	6
1.2.2 Organisation génomique du virus	8
1.2.3 Caractéristiques physico-chimiques du virus	11
1.2.4 Biologie du virus sauvage	14
a. Cycle viral.....	16
b. Régulation de l'expression des gènes de l'AAV.....	16
c. Devenir du génome viral dans la cellule	19
➤ En l'absence d'adénovirus.....	19
➤ En présence d'adénovirus	20
d. Réplication et encapsidation du génome de l'AAV : formation de particules virales.....	22
➤ Réplication	22
➤ Assemblage de particules.....	24
➤ Mécanisme d'encapsidation	24
1.3 L'Adeno-Associated Virus recombinant (AAVr) développé comme vecteur en transfert de gènes	25
1.3.1 Production de particules d'AAVr	25
a. Production des vecteurs de sérotype 2	25
b. Production des sérotypes autres que l'AAV-2.....	31
c. Avancées dans le domaine de la production et de la purification de vecteurs	33
1.3.2 Mécanisme de la transduction et persistance du génome	34
a. Voies d'entrée et trafic intracellulaire de l'AAVr.....	35
➤ Adhésion à la cellule	35
➤ Endocytose et trafic intracellulaire	39
➤ Import nucléaire et décapsidation	43
b. Conversion du génome simple brin en double brin.....	45
c. Formes de persistance du génome double brin.....	48
1.3.3 Transfert de gène in vivo	53
a. Tropisme et utilisation des différents sérotypes de l'AAV	53
b. Transfert de gène dans le poumon	54
c. Transfert de gène dans le foie	58
d. Transfert de gène dans la rétine	64
e. Transfert de gène dans le cerveau	68
f. Transfert de gène dans le muscle squelettique	71
➤ Transfert du gène de l'Epo.....	79
g. Modification du tropisme des vecteurs AAVr	84

1.4 Régulation de l'expression d'un transgène	87
1.4.1 Nécessité de réguler l'expression d'un transgène	87
1.4.2 Utilisation de systèmes de régulation <i>in vivo</i>	87
 2. Résultats	94
2.1 Objectifs : efficacité de la régulation avec un système tétracycline.....	94
Premier article	97
2.2 Discussion du premier article.....	107
2.3.1 Efficacité de la régulation	107
2.3.2 Utilisation de l'AAVr de sérotype 1 dans le muscle de primate.....	111
2.3.3 Persistance de la régulation après transfert de gène dans le muscle de primate (résultats complémentaires).....	113
Deuxième article	122
2.3 Discussion du deuxième article	125
2.3.1 Transfert du gène de l'Epo et réponse immune	125
2.3.2 Cinétique de la réponse humorale dirigée contre l'Epo produite par transfert de gène (résultats complémentaires).....	127
Troisième article	134
2.4 Discussion du troisième article.....	137
2.4.1 Dopage génétique	137
2.4.2 Analyse par Isoelectric focusing des formes sériques de l'Epo endogène et de l'Epo produite par transfert de gène	138
 3. Conclusion générale	141
 4. Références bibliographiques.....	144

Préambule

Au cours de nos travaux de thèse, nous avons utilisé les vecteurs dérivés de l'*Adeno-Associated Virus* (AAV). L'évaluation *in vivo* de vecteurs AAV recombinants (AAVr) dans des modèles petits et gros animaux a montré que le transfert de gène était efficace et stable dans de nombreux organes comme le muscle, le foie, le poumon, le système nerveux central et la rétine. Le développement récent de sérotypes présentant des tropismes qui leur sont propres permet de choisir le vecteur adapté à l'organe cible. Nous avons utilisé les vecteurs de sérotypes 1 et 2 dans le muscle de souris et de primate, véhiculant l'ADN complémentaire (ADNc) de l'érythropoïétine (Epo) homologue utilisé comme gène rapporteur, placé sous le contrôle du système inductible Tet-On. Ce système repose sur l'utilisation d'un transactivateur (rtTA) qui induit l'expression du transgène en présence d'un inducteur (doxycycline, Dox).

Nos travaux font suite à des études faites chez la souris (Bohl et al., 1998) et le primate (Favre et al., 2002), qui montraient une expression du transgène en l'absence d'inducteur, incompatible avec un développement clinique sécurisé. De plus, l'étude de Favre et al (Favre et al., 2002) montrait l'apparition d'une réponse immunitaire contre le rtTA, avec détection d'effecteurs T dirigés contre le transactivateur (tests Elispot IFN- γ) et d'infiltrats inflammatoires lymphocytaires dans le muscle cible, aboutissant à une perte de l'expression du transgène chez la quasi-totalité des animaux.

Nous avons évalué l'efficacité de nouvelles constructions du système de régulation, les cassettes d'expression du transactivateur et du transgène étant clonées dans un vecteur unique. Après une étape de criblage chez la souris, nous avons montré que l'efficacité de la régulation est améliorée par l'utilisation de versions optimisées du transactivateur (rtTA2^s-M2) (Urlinger et al., 2000) et qu'elle est fonction de l'orientation relative des cassettes d'expression. Toutefois, la régulation ne persiste pas chez le primate, malgré l'utilisation d'un promoteur tissu-spécifique (promoteur de la desmine humaine) (Li and Paulin, 1991). La perte de l'expression du transgène s'accompagne de la détection d'anticorps dirigés contre le transactivateur et d'infiltrats inflammatoires lymphocytaires dans les muscles cibles.

Nous avons comparé l'efficacité du transfert de gène médié par l'AAV-1 et l'AAV-2. Les résultats obtenus confirment globalement ce qui avait été montré dans des modèles murins (Chao et al., 2000) (Chao et al., 2001) (Gao et al., 2002) (Gao et al., 2004b) et canins (Arruda et al., 2004) ; dans notre étude, l'utilisation d'AAV-1 permet une augmentation de l'expression du transgène d'un facteur dix environ.

Toutefois la surexpression d'Epo par le muscle s'accompagne d'effets secondaires ; deux primates parmi les huit utilisés ont développé une anémie auto-immune, avec apparition d'anticorps dirigés contre la l'Epo endogène. Le développement de l'anémie semble corrélé aux taux d'Epo sécrétés, toutefois le faible nombre d'animaux utilisés ne permet pas de tirer de conclusion. Les mécanismes impliqués ne sont pas clairs et la protéine surexprimée par le muscle présente un profil de migration en *Isoelectric focusing* différent de l'Epo endogène, produite par le rein.

Après une introduction présentant le virus AAV sauvage, les vecteurs qui en sont dérivés et leur l'utilisation *in vivo*, nous articulerons la présentation de nos résultats autour de trois articles faisant l'objet de discussions séparées.

1. Introduction

1.1 La thérapie génique

L'objectif de la thérapie génique est de corriger ou ralentir la progression d'une maladie, qu'elle soit héréditaire ou acquise. Une des approches consiste à introduire dans une cellule malade une copie normale d'un gène sous forme d'ADN complémentaire.

Loin de vouloir présenter une vision exhaustive de la discipline, efforçons nous toutefois d'en souligner les points-clés.

La thérapie génique peut être abordée de deux manières : l'apport de gènes comme médicaments ou la réparation des gènes. Le premier point fait aujourd'hui figure d'applications cliniques. Les méthodes entreprises passent par l'apport d'un gène thérapeutique soit directement dans la cellule malade (induction de l'apoptose dans le cas de la thérapie génique du cancer, ou apport d'une ou plusieurs copies d'un gène normal dans une cellule qui présente un gène muté), soit dans un autre type cellulaire servant alors à produire et sécréter à partir de l'ADN introduit une protéine thérapeutique ou déficiente dans l'organisme (facteurs de coagulations, enzymes cellulaires, érythropoïétine, hormone de croissance...). Le champ des applications paraît sans fin.

Pourtant le facteur limitant reste l'apport efficace du gène dans la cellule, sa fonctionnalité et surtout sa persistance. Etape préliminaire de la thérapie génique, le transfert de gènes *sensu stricto* en est aussi un des points clés. Celui-ci peut s'effectuer *ex vivo* ou *in vivo*. Le choix de la technique utilisée dépend du type cellulaire à transduire et du vecteur utilisé. La technique *ex vivo* consiste à apporter l'ADN à des cellules autologues (prélevées à l'animal ou au patient), qui sont ensuite réimplantées. D'autres essais, beaucoup plus nombreux, se sont orientés vers des transferts *in vivo*, où le gène est apporté directement à l'animal ou au patient, par injection le plus souvent.

L'apport d'un gène au sein d'une cellule peut se faire soit en utilisant de l'ADN nu, soit en utilisant un vecteur (viral ou non viral).

Le transfert à l'aide d'ADN nu est d'efficacité limitée, et peut nécessiter la perméabilisation de la membrane cellulaire (par choc électrique, en complément de l'injection intramusculaire par exemple). Les vecteurs non viraux sont des lipides cationiques synthétiques favorisant la pénétration dans la cellule par formation d'un complexe avec l'ADN.

Les vecteurs viraux sont des virus recombinants. Ils dérivent de virus dont tout ou une partie de leur génome est remplacée par le transgène, les rendant défectifs pour la réplication. L'efficacité du transfert de gène dépend d'une part de l'interaction de la capsid ou de l'enveloppe virale avec les récepteurs cellulaires, et d'autre part du devenir de l'ADN transféré dans la cellule. Ainsi l'apport de l'ADN dépendra du tropisme propre au vecteur et le choix de celui-ci sera fonction de l'organe cible. Dans l'optique de soigner des maladies génétiques, la visée du transfert de gène est la persistance du gène transféré dans la cellule malade. La stabilité du transgène ne passe pas forcément par l'intégration de celui-ci dans le génome cellulaire et les formes de persistance dépendent de la biologie du vecteur.

Les vecteurs viraux sont dérivés des rétrovirus, des adénovirus, des virus adéno-associés (AAV, pour *adeno-associated virus*), ou des virus herpès simplex (voir Figure 1.A : « Tableau comparatif des vecteurs viraux de transfert de gène »).

Les rétrovirus sont intégratifs. L'ADN rétroviral, après une étape de rétro-transcription, s'intègre dans le génome cellulaire, atout majeur en terme de persistance du transgène. Si les rétrovirus recombinants obtenus à partir de rétrovirus leucémogènes murins ne s'intègrent que dans des cellules en division, les vecteurs dérivés des lentivirus (HIV, SIV, FIV) transduisent les cellules quiescentes et y sont intégratifs. Toutefois leur production et leur purification ne sont pas complètement maîtrisées.

Les adénovirus transduisent efficacement les cellules post-mitotiques et sont produits facilement. Toutefois, l'immunogénicité de la capsid et des protéines virales exprimées des vecteurs de première et seconde générations (délétés respectivement des gènes E1/E3 et E1/E3/E4/E2) empêchait toute expression à long terme du transgène. La production d'adénovirus « *gutless* », délétés de la totalité du génome sauvage, a permis de réduire considérablement l'immunogénicité du vecteur et de prolonger l'expression du transgène. Ces derniers offrent une grande capacité d'encapsidation (jusqu'à 30 kb).

A.

Vecteur viral	Taille du transgène	Infection de cellules quiescentes	Intégration	Réponse immunitaire contre la capsid ou l'enveloppe	Réponse immunitaire contre le transgène
MoMuLV	7-8 kb	-	+	+	-
Rétrovirus					
SIV/HIV	7-8 kb	+	+	+	?
Adénovirus	30 kb	+	-	++ (humorale et cellulaire)	++
AAV	4,6 kb	+	+/-	++ (humorale)	+/-
HSV	20-30 kb	+	-	+	?

B.

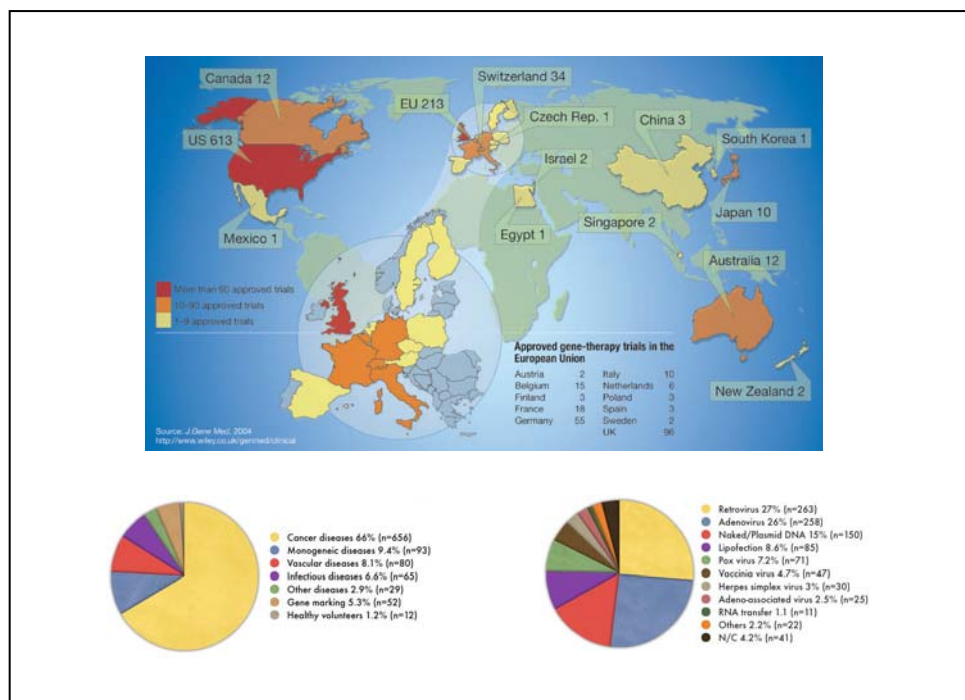


Figure 1 : Vecteurs utilisés en transfert de gène et essais cliniques

A. Tableau comparatif des différents vecteurs de transfert de gène. Le tableau regroupe de manière simplifiée les principales caractéristiques des vecteurs viraux les plus utilisés en transfert de gène : **Rétrovirus** dérivés des virus leucémogènes murins (MuMoLV : murine Moloney leukemia virus) et des lentivirus (SIV : simian immunodeficiency virus, HIV : human immunodeficiency virus), **Adénovirus**, **AAV** et **HSV** (Herpes simplex virus).

B. Répartition des essais cliniques dans le monde et distribution selon les maladies traitées et les vecteurs utilisés (source : John Wiley and Sons, Ltd, www.wiley.co.uk/genmed/clinical). Près de 1000 protocoles cliniques de thérapie génique ont été initiés depuis 1989, dont la grande majorité aux Etats-Unis et appliqués au cancer. Les essais concernant des maladies monogéniques représentent moins de 10% des essais cliniques. L'AAV est impliqué dans 2,5 % des protocoles.

A l'inverse, les vecteurs dérivés des AAV sont très bien tolérés et permettent une expression du transgène à long terme. L'ADN transféré s'intégrerait peu et persiste en grande majorité sous forme épisomique. Ils transduisent également les cellules quiescentes. Les procédés de production et de purification ont été largement améliorés au cours de la dernière décennie. Leur point faible est leur faible capacité d'encapsulation.

Près de 1000 essais cliniques en thérapie génique ont été initiés depuis 1989 (source : *John Wiley and Sons Ltd*, www.wiley.co.uk/genmed/clinical) (Figure 1.B : « Répartition des essais cliniques dans le monde, distribution selon les maladies traitées et vecteurs utilisés »), dont 63% de phase I et 1,7 % de phase III. La majorité est incluse dans des études de cancérologie, seuls 93 d'entre eux concernent des maladies monogéniques.

L'AAV a été utilisé dans 25 protocoles cliniques, tous de phase I et réalisés la plus souvent aux Etats-Unis (22 protocoles sur 25). Ils concernent en majorité (16 sur 25) des maladies monogéniques (mucoviscidose, hémophilie B avec transfert dans le muscle ou le foie, myopathie des ceintures (LGMD : *Limb Girdle Muscular Dystrophy*), maladie de Canavan, déficit en α -1 antitrypsine).

1.2 L'Adeno-Associated Virus

1.2.1 Généralités sur le virus

L'AAV est un petit virus nu à ADN linéaire simple brin de la famille des *Parvoviridae*. Cette famille comprend deux sous-familles : les *Parvovirinae*, qui infectent les vertébrés, et les *Densovirinae*, qui infectent les insectes. Les *Parvovirinae* regroupent trois genres : les Parvovirus autonomes, les Erythrovirus et les Dependovirus auxquels appartient l'AAV.

Neuf sérotypes ont été clonés et évalués en transfert de gène (pour synthèse, (Gao et al., 2002) et (Gao et al., 2004b)). Le sérotype 2 a été le premier sérotype cloné et évalué en tant que vecteur (Samulski et al., 1982), pour revue voir (Snyder, 1999). L'AAV recombinant a

recontré un succès grandissant en transfert de gènes *in vivo* et le sérotype 2 a été jusque dans ces dernières années le plus utilisé pour la génération de virus recombinants.

L'AAV-2 est un parvovirus humain non pathogène. Il circule largement dans la population ; selon les auteurs, 80 à 95 % de la population présente des anticorps dirigés contre l'AAV-2, suite à une infection majoritairement dans la petite enfance, une minorité présente des anticorps neutralisants (Chirmule et al., 1999) (Xiao et al., 1999) (Moskalenko et al., 2000), pour revue voir (Sun et al., 2003), laissant a priori une majorité de la population humaine réceptive à un transfert de gène médié par l'AAV. 5% des individus présentent une réponse Th1.

C'est un virus défectif (Dependovirus) : il ne se réplique qu'à la faveur d'une co-infection par un virus auxiliaire (Adénovirus ou Herpes virus). En l'absence de co-infection, le virus sauvage entre dans une phase de latence qui se caractérise *in vitro* par l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, en un site spécifique du chromosome 19 (Kotin et al., 1990). L'intégration de l'AAV recombinant (AAVr) reste moins bien définie.

A l'origine, l'AAV a été identifié comme contaminants de préparations d'adénovirus il y a environ 40 ans (Atchison et al., 1965) (Hoggan et al., 1966), (cités par (Rutledge et al., 1998)). Plus précisément, seuls les sérotypes 1, 2, 3, 4, et 6 ont été isolés à partir de préparations d'adénovirus. Le sérotype 6 apparaît comme un recombinant entre les sérotypes 1 et 2 (Xiao et al., 1999). Des séquences d'AAV-2 et -3 ont été amplifiées à partir d'écouvillonnages de la gorge et de fèces chez des enfants. Le génome de l'AAV-2 a également été détecté dans les cellules mononucléées sanguines (Grossman et al., 1992), dans des produits d'avortements spontanés (Tobiasch et al., 1994), dans le tissu testiculaire (Mehrlé et al., 2004) et le sperme humain (Erles et al., 1999). L'AAV-5 a été isolé à partir d'un condylome (voir (Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984)). Toutefois, aucune séquelle clinique n'a été associée à l'infection par l'AAV. La caractérisation du sérotype 2 et son évaluation en transfert de gène date des années 1980 (Samulski et al., 1982). Le clonage des sérotypes 1, 3, 4, 5 et 6 a été fait entre fin 1990 et début 2000 (AAV-3, -4 et -6 : (Rutledge et al., 1998), AAV-1 : (Xiao et al., 1999), AAV-5 : (Chiorini et al., 1999)).

Les études séroépidémiologiques suggèrent que les sérotypes 2, 3 et 5 seraient d'origine humaine, alors que le sérotype 4 serait d'origine simienne. Les études sérologiques faites chez

le primate (réduites toutefois) indiquent que 25 % des individus présentent des anticorps neutralisants contre l'AAV-2 (Xiao et al., 1999), suggérant que le virus circulerait entre les espèces. On ne connaît pas avec précision l'espèce réservoir de l'AAV-1 (et de l'AAV-6) puisqu'il n'a jamais été isolé à partir de tissus et que l'on trouve des anticorps chez l'homme et le singe. Une étude sérologique montre que près de 60% des primates (macaques rhesus) présentent des anticorps neutralisants contre l'AAV-1 et qu'aucun ne présente de réponse humorale contre l'AAV-2 sans réponse contre l'AAV-1 (Xiao et al., 1999). Ceci suggère que l'AAV-1 serait endémique chez cette espèce.

Les sérotypes 7 et 8 ont été isolés puis clonés plus récemment à partir de myocarde de primates ayant reçu des vecteurs adénoviraux, en utilisant des amorces s'hybridant de part et d'autre d'une région hypervariable de 255 bases (nucléotides 2886 à 3143) identifiée par alignement de séquence des sérotypes 1 à 6 (Gao et al., 2002). Les groupes de macaques rhesus et cynomolgus étudiés sont en grande majorité séropositifs contre l'AAV-7 et -8 (Gao et al., 2003). 30 clones supplémentaires, distincts entre eux d'au moins 7 acides aminés, ont été isolés récemment à partir de tissus de primates (macaque rhesus, macaque cynomolgus, chimpanzé et babouin) (Gao et al., 2003). Une étude plus récente faite également par le groupe de Jim Wilson a permis d'isoler 55 clones (distincts entre eux d'au moins 4 acides aminés) à partir de tissus humains, dont le sang, et 53 clones simiens à partir de tissus de macaques d'espèces variées (*M. mulata*, cynomolgus, *nemestrina*), de babouins et de chimpanzés (Gao et al., 2004b). Il est dommage que les auteurs ne précisent pas le nombre moyen de génomes viraux par génome eucaryote, pourtant analysé par PCR quantitative.

1.2.2 Organisation génomique du virus

C'est en outre un virus d'organisation génomique simple (Srivastava et al., 1983). Son génome se compose d'une molécule d'ADN simple brin de 4679 bases (Srivastava et al., 1983)), GenBank AF043303) et présente deux cadres de lecture ouverts : *rep* et *cap*, encadrés par deux séquences terminales, ou ITR, identiques et inversées, de 145 bases chacune dans le cas de l'AAV-2 (Berns, 1996), (Muzyczka, 1992)) (voir Figure 2 : « Organisation génomique de l'AAV-2 sauvage »).

Le gène *rep* code pour quatre protéines régulatrices (Rep 78/68 et 52/40 impliquées notamment dans la réplication du virus) et *cap* pour trois protéines structurales (VP1, VP2 et VP3 constituant la capsid). L'expression des quatre protéines Rep, de masses moléculaires respectives 78, 68, 52 et 40 kDa, est placée sous le contrôle des deux promoteurs p5 et p19. Les protéines Rep 68 et 78 sont codées par un transcrit commun initié à partir de p5. Elles diffèrent dans leur partie C-terminale suite à un épissage alternatif à partir du transcrit commun. Il en est de même pour Rep 52 et 40 à partir de p19. Les protéines Rep 78/68 seraient impliquées dans l'épissage (Qiu and Pintel, 2002).

Les protéines cap (VP 1, VP 2, VP 3), de masses moléculaires respectives 90, 72 et 60 kDa sont codées à partir d'un transcrit commun initié à partir du promoteur p40. Elles diffèrent dans leur partie N-terminale suite à un épissage alternatif à partir de ce transcrit commun.

Les ITR sont les seuls signaux nécessaires en *cis* pour la réplication, l'encapsidation et la mobilisation du génome viral. Chaque ITR est composé de 6 régions complémentaires (A/A', B/B' et C/C') de 125 nucléotides et d'une région unique D de 20 nucléotides. De part la présence de séquences palindromiques internes (B/B', C/C'), les ITR se replient sur eux-mêmes pour former une structure en épingle à cheveux (ou "hairpin") en forme de T (voir Figure 2 page suivante : "Organisation génomique de l'AAV sauvage"). Les ITR forment donc une structure simple brin sur les 125 premiers nucléotides, la région D unique restant sous forme simple brin. La région A comporte une séquence RBS (*Rep Binding Site*, où se fixent les protéines Rep 78/68 (McCarty et al., 1994)). Un site de coupure dépendant des Rep (*trs* : *terminal resolution site*) se trouve en 5' de l'ITR 3' à la jonction entre la séquence D et la structure en épingle à cheveux de l'ITR. Il fait l'objet d'une coupure spécifique par Rep 78/68. Le p5 comporte un site RBS et des sites semblables sont retrouvés au niveau du promoteur p19.

L'alignement des séquences des sérotypes 1 à 8 montre que l'AAV-5 est le plus différent, avec 67% d'homologie comparé à l'ORF Rep de l'AAV-2 et 60% avec la séquence Cap (Chiorini et al., 1999). L'ITR de l'AAV-5 a une homologie de 56% avec l'ITR de sérotype 2, mais il conserve tout de même une structure secondaire identique (Chiorini et al., 1999).

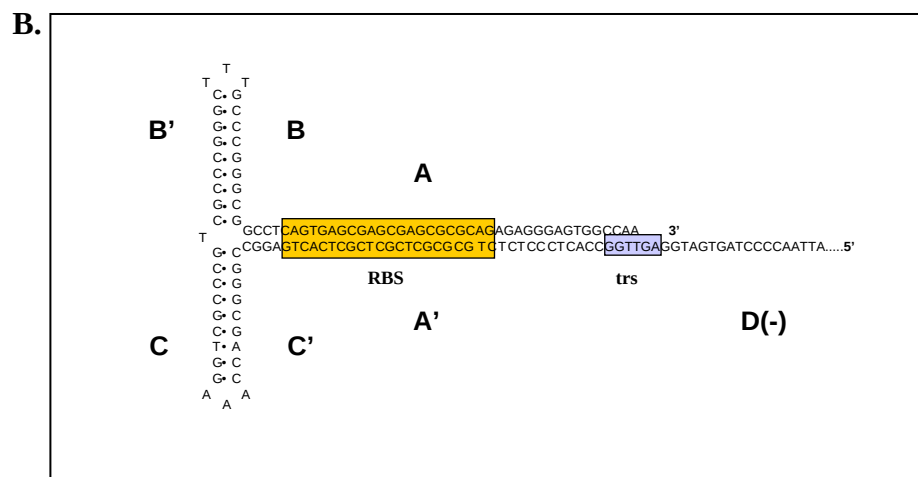
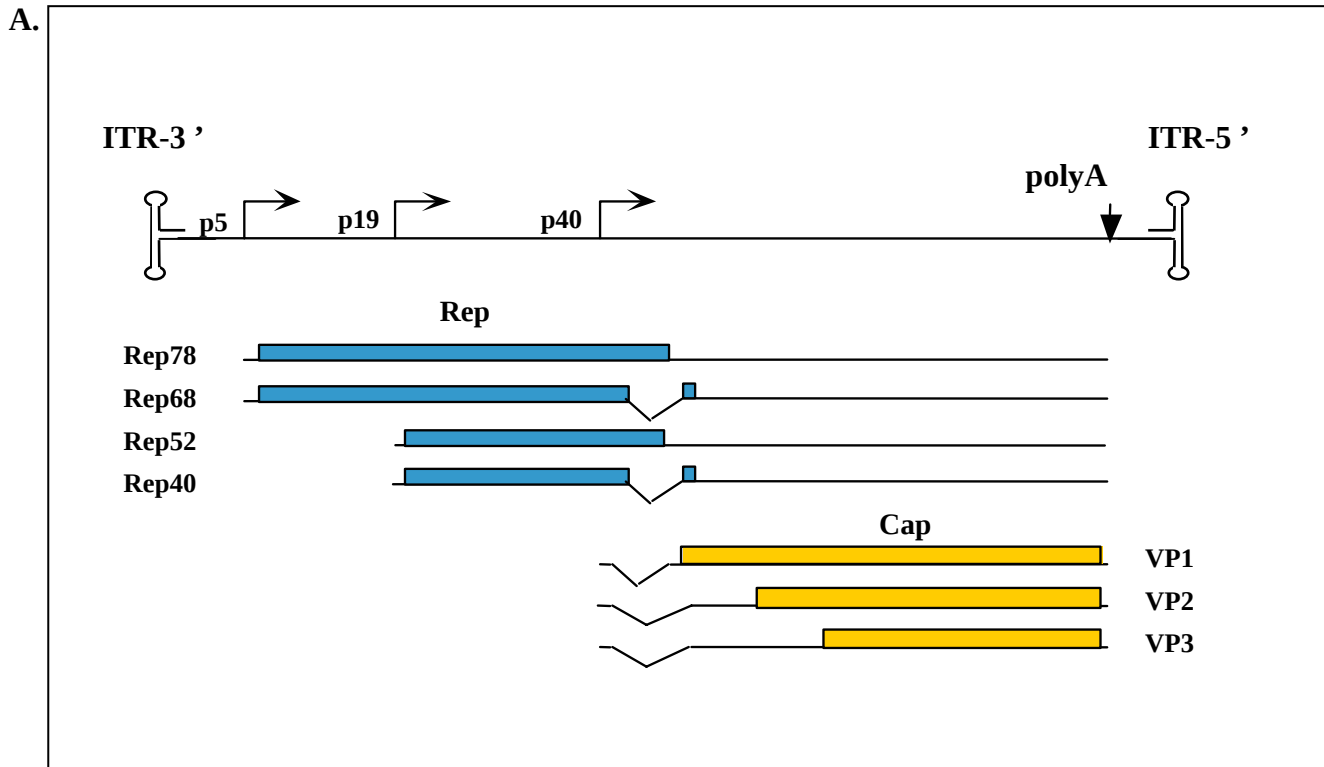


Figure 2 : Organisation génomique de l'AAV-2 sauvage

A. Génome de l'AAV sauvage (brin (-)). Le génome de l'AAV-2 se compose d'une molécule d'ADN simple brin de 4679 nucléotides, de polarité positive ou négative. Les gènes *rep* et *cap* sont encadrés par les séquences ITR (« *Inverted Terminal Repeats* ») de 145 nucléotides. Les protéines Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40 sont codées par les transcrits initiés aux promoteurs p5 et p19 par épissage alternatif. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont issues de transcrits initiés au promoteur p40. **B. Séquence et structure secondaire de l'ITR 3' de l'AAV-2.** Les domaines de fixation RBS (« *Rep Binding Site* ») et de coupure spécifique trs (« *terminal resolution site* ») des protéines Rep 78/68 sont indiqués. Chaque ITR est composé de 6 régions complémentaires (A/A', B/B' et C/C') de 125 nucléotides et d'une région unique D de 20 nucléotides.

A l'inverse, la comparaison de la séquence codante de VP1 des sérotypes 1 et 6 montre 97% d'homologie (Gao et al., 2002). La composition du génome de l'AAV-6 provient d'une recombinaison entre les sérotypes 1 et 2 (Xiao et al., 1999) : ITR gauche et promoteur p5 de l'AAV-2, le reste des séquences codantes rep et cap et l'ITR droit sont identiques à l'AAV-1. Les mêmes alignements faits avec les autres sérotypes montrent des résultats entre 66% (comparaison AAV-2/AAV-4, soit 60% d'homologie sur la séquence d'acides aminés) à 86% (comparaison AAV-7/AAV-8). Les sérotypes 2 et 3 sont assez proches (82% d'homologie sur la séquence codante, 88% sur la protéine VP1), il en est de même pour les sérotypes 1, 7 et 8 (83% à 84% d'homologie sur la séquence nucléotidique, soit 84 à 85% sur la séquence d'acides aminés).

Ces différences, en relation avec la structure tertiaire des VP, peuvent expliquer les différences de tropisme d'un sérotype à l'autre.

Les sérotypes 1 à 8 ainsi que les clones isolés récemment à partir de tissus humains et simiens (Gao et al., 2003) (Gao et al., 2004b), ont fait l'objet d'une classification phylogénétique basée sur la séquence codante de VP1 (Gao et al., 2004b). L'étude a défini 11 groupes phylogénétiques et a permis de dégager un clone distinct sérologiquement et baptisé AAV-9. Ce sérotype et d'autres clones sont à l'heure actuelle évalués en transfert de gène.

1.2.3 Caractéristiques physico-chimiques du virus

La capside de l'AAV constitue une particule de 20 à 24 nm de diamètre. Elle résulte de l'assemblage de 60 sous unités protéiques (VP1, VP2 et VP3) organisées selon une symétrie icosaédrique. La détection des protéines de capside par Western Blot montre que VP3 est largement majoritaire et que les VP sont présentes selon un ratio 1 : 1 : 18 pour l'AAV-2, soit 90% de VP3, 5% de VP2 et 5% de VP1 (Rose et al., 1971). Leurs masses moléculaires respectives sont 87, 73 et 62 kDa (Muzyczka, 1992) (Berns, 1996).

L'analyse du cycle réplcatif de l'AAV sauvage montre qu'environ 10^6 génomes simple brin sont encapsidés dans chaque cellule pour former des particules matures, dont à peu près

1% sont des particules infectieuses. Des particules vides sont également produites en quantité 10 fois supérieure. Les particules matures (*i.e* ayant encapsidé la totalité du génome viral) migrent sur gradient de chlorure de césium à une densité comprise entre 1,39 et 1,42 g/cm². Les particules virales sont particulièrement stables. Le virus résiste en effet à des pH compris entre 3 et 9 ainsi qu'au chloroforme et garde son pouvoir infectieux après un chauffage d'une heure à 56°C. Les particules immatures, c'est-à-dire ayant encapsidé un génome incomplet, sont nettement moins résistantes à ces traitements.

La structure de la capside de l'AAV a été identifiée par Kronenberg et al (Kronenberg et al., 2001) en microscopie électronique. La Figure 3 (page suivante) (« Structure de la capside de l'AAV-2 ») représente une vue tridimensionnelle des faces externes (A, C, E) et interne (B, D, F) de la capside. En fonction de l'angle sous lequel on regarde la particule virale, on peut distinguer trois axes de symétrie. Les schémas A et B sont vus selon un axe de symétrie d'ordre 2, C et D selon un axe de symétrie d'ordre 3 et E et F d'ordre 5. Ces caractéristiques sont conservées chez des parvovirus autonomes, en particulier le virus de la maladie aléoutienne du Vison d'Amérique (ADV), du parvovirus canin (CPV) et l'AAV-5 (Kronenberg et al., 2001) (voir également Figure 4 « Structure de la capside de l'AAV-5 » et paragraphes suivants). La caractéristique la plus manifeste est le regroupement de trois pics entourant des trous selon l'axe de symétrie d'ordre 3 (Figure 3.1-C). Ces pics forment des protubérances d'environ 2 nm sur la capside. Les trous sont vraisemblablement comblés en grande partie par des protubérances au niveau de la face interne de la capside (Figure 3.1-D). Les axes de symétrie 5 sont entourés de pics d'une hauteur de 1,2 nm disposés en étoile. Ils entourent des canaux creux reliant l'intérieur de la capside au milieu extérieur (diamètre internes et externes de 1,6 et 0,8 nm respectivement).

Plus tard, le groupe de Chapman a identifié la structure atomique de l'AAV-2 par cristallographie aux rayons X à une résolution de 3 Angström (Xie et al., 2002). Ces travaux font référence pour tous ceux qui ont suivi et se sont intéressés aux motifs de fixation à l'héparine (voir la partie « Voies d'entrée et trafic intracellulaire de l'AAVr »). La structure tertiaire des sous-unités a pu être définie (Figure 3.3). Ces sous-unités s'associent en trimères (Kern et al., 2003) (Opie et al., 2003).

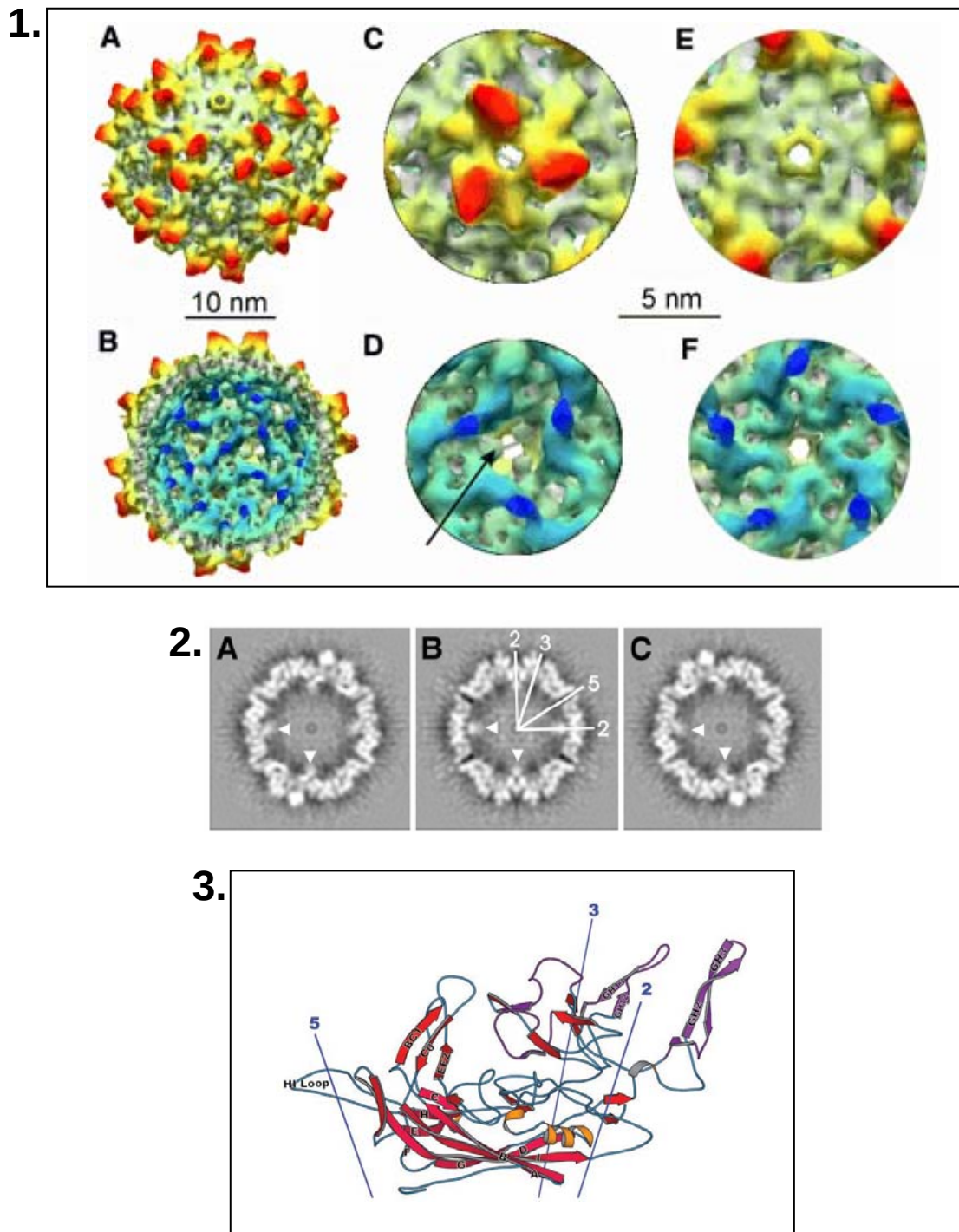


Figure 3 : Structure de la capside de l'AAV-2

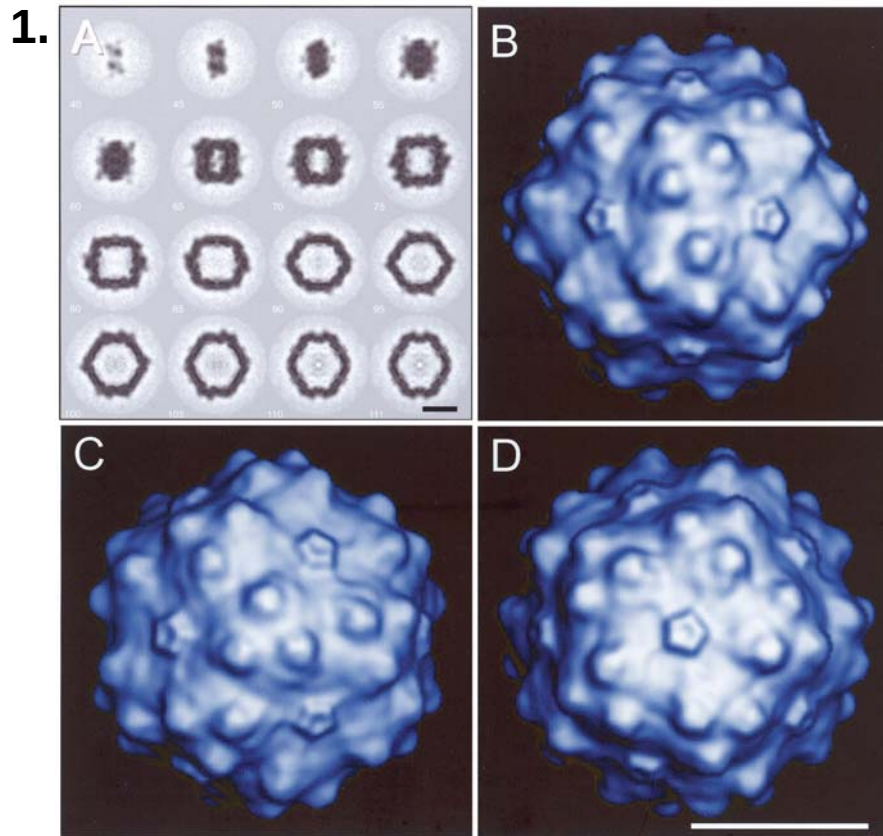
1. Vue tridimensionnelle de la capside d'AAV-2 (d'après Kronenberg et al., 2001). (A, C et E) montrent la surface externe de la capside et (B, D et F) la surface interne, analysées en microscopie électronique. En (A) et (B), la carte est observée selon l'axe de symétrie axiale d'ordre 2 ; (C) et (D) montrent des vues selon l'axe de symétrie 3 et (E) et (F) selon de l'axe de symétrie 5. La flèche en (D) indique une des trois protubérances qui bloquent le trou observé au niveau de l'axe de symétrie 3. **2. Coupes orthogonales de la capside d'AAV-2 (d'après Kronenberg et al., 2001).** B : coupe équatoriale. A et C : coupes orthogonales réalisées à 0.44 nm de part et d'autre de B. Les axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 sont représentés. **3. Modèle de la structure tertiaire d'une sous-unité de la capside d'AAV-2 (d'après Xie et al., 2002).** Les axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 sont représentés. La structure en tonneau bêta est situé sur la face interne de la capside (rouge), avec des feuillettes disposé sur deux couches, dénommés d'une manière classique A, B, I, D et C, H, E et F. Les boucles sont dénommées selon les feuillettes qu'elles relient (par exemple, « GH loop »). Les régions où les séquences diffèrent significativement en fonction des sérotypes sont colorées en mauve.

Les particularités décrites pour le sérotype 2 sont conservées dans le cas de l'AAV-5. Walters et al (Walters et al., 2004) ont comparé la structure des sérotypes 2 et 5 par cryo-microscopie électronique à des résolutions comprises entre 16 et 21 Angström (Figure 4 page suivante : « Structure de la capsid de l'AAV-5 »). On retrouve également une dépression à chaque axe de symétrie d'ordre 2, trois reliefs adjacents à chaque axe de symétrie d'ordre 3 et une dépression superficielle entourée par 5 protubérances disposées en étoile autour de chaque axe de symétrie d'ordre 5. Toutefois l'étude ne dit pas si l'on retrouve un canal à ce niveau. La capsid de l'AAV-2 a apparemment une structure plus « épineuse » que l'AAV-5 (Figure 4.2). Ceci serait dû aux boucles de VP3 dont la structure tertiaire légèrement différente de l'AAV-2 formerait des pics plus prononcés (Figure 4.2-C). La séquence d'acides aminés à l'extrémité C terminale de VP3 n'est que d'environ 10%, comparée à l'AAV-2 (Bantel-Schaal et al., 1999). Au vu de l'importance de chaque sérotype, et notamment celle du sérotype 1 dans notre étude de manière globale dans le muscle (voir partie « transfert de gène dans le muscle »), il faut regretter qu'aucune étude comparative avec la capsid de l'AAV-1 n'ait été faite à ce jour.

1.2.4 Biologie du virus sauvage

Nous exposerons ici la biologie du virus sauvage de sérotype 2.

L'organisation génomique de l'AAV donne une place prépondérante aux protéines Rep qui agissent à diverses étapes du cycle viral. Ce sont en effet des protéines multifonctionnelles. Les Rep 78/68 ont des fonctions de liaison à l'ADN (domaine de liaison aux RBS de l'ITR et du p5 à l'extrémité N terminale), d'endonucléase par interaction avec les trs de l'ITR 3', d'hélicase et d'ATPase. Les Rep 52/40 ont des activités hélicase et ATPase.



2.

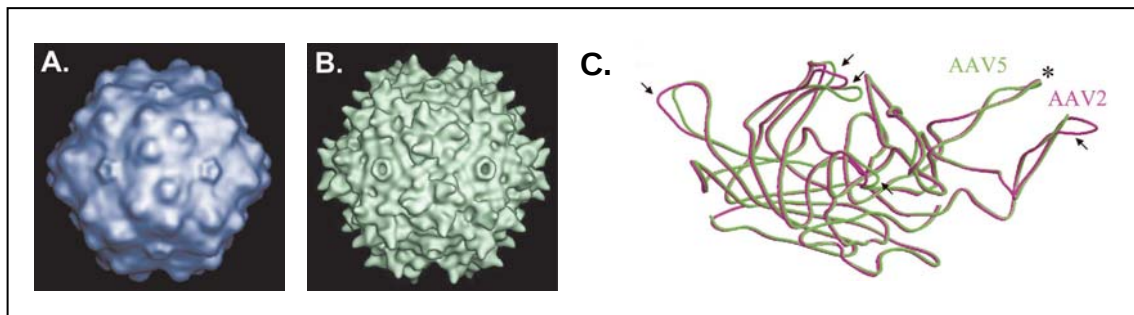


Figure 4 : Structure de la capside de l'AAV-5 (d'après Walters et al., 2004).

1. Reconstituion tridimensionnelle de la capside de l'AAV-5. L'encart A représente des coupes séquentielles de la capside vues selon un axe de symétrie 2 par microscopie électronique à transmission. Les images B, C et D représentent des reconstitutions de la surface de la capside, vues selon un axe de symétrie 2 (B), 3 (C) et 5 (D). Les reconstitutions sont faites avec une résolution de 16 Angström. La barre représente 10 nm. **2. Comparaison de la structure de la capside des sérotypes 2 et 5.** Les images A et B représentent une reconstitution de la capside de l'AAV-5 (A) et -2 (B) à une résolution de 21 Angström. L'encart C figure une superposition des modèles de la strcuture tertiaire de VP3 de l'AAV-5 (en vert) et de l'AAV-2 (en mauve). Les différences concernent les boucles de surface marquées par un flèche. L'astérisque identifie une des boucles impliquées dans la fixation à l'héparine de l'AAV-2.

a. Cycle viral

L'AAV ne se réplique qu'à la faveur d'une co-infection par un virus *helper* (Adénovirus, Herpes virus (Weindler and Heilbronn, 1991) (Ward et al., 2003), Cytomégalovirus ou Virus de la Vaccine). Lorsque l'AAV infecte une cellule en l'absence de virus *helper*, il entre dans une phase de latence pendant laquelle les promoteurs p5, p19 et p40 sont silencieux. Il a été montré in vitro que le génome viral s'intégrait alors de façon spécifique au niveau du site AAVS1 du chromosome 19 (Kotin et al., 1990) (Samulski et al., 1991) (Linden et al., 1996a) (Linden et al., 1996b).

En présence d'adénovirus, l'AAV entre dans une phase lytique qui se caractérise par la production des protéines de l'AAV, la réplication et l'encapsidation de son génome aboutissant au relargage de particules infectieuses hors de la cellule suite à l'effet cytopathique provoqué par l'adénovirus. Cette phase s'accompagne également de la production de particules infectieuses d'adénovirus. Elle peut également être provoquée par infection adénovirale d'une cellule infectée de façon latente par l'AAV, ce qui conduit à la « réactivation » du génome de l'AAV, à sa réplication et sa transcription pour donner de nouvelles particules infectieuses (voir Figure 5.A page suivante « Représentation schématique du cycle viral de l'AAV »).

b. Régulation de l'expression des gènes de l'AAV

La régulation des gènes de l'AAV est un phénomène complexe qui fait intervenir les protéines Rep en tant qu'éléments activateurs ou répresseurs.

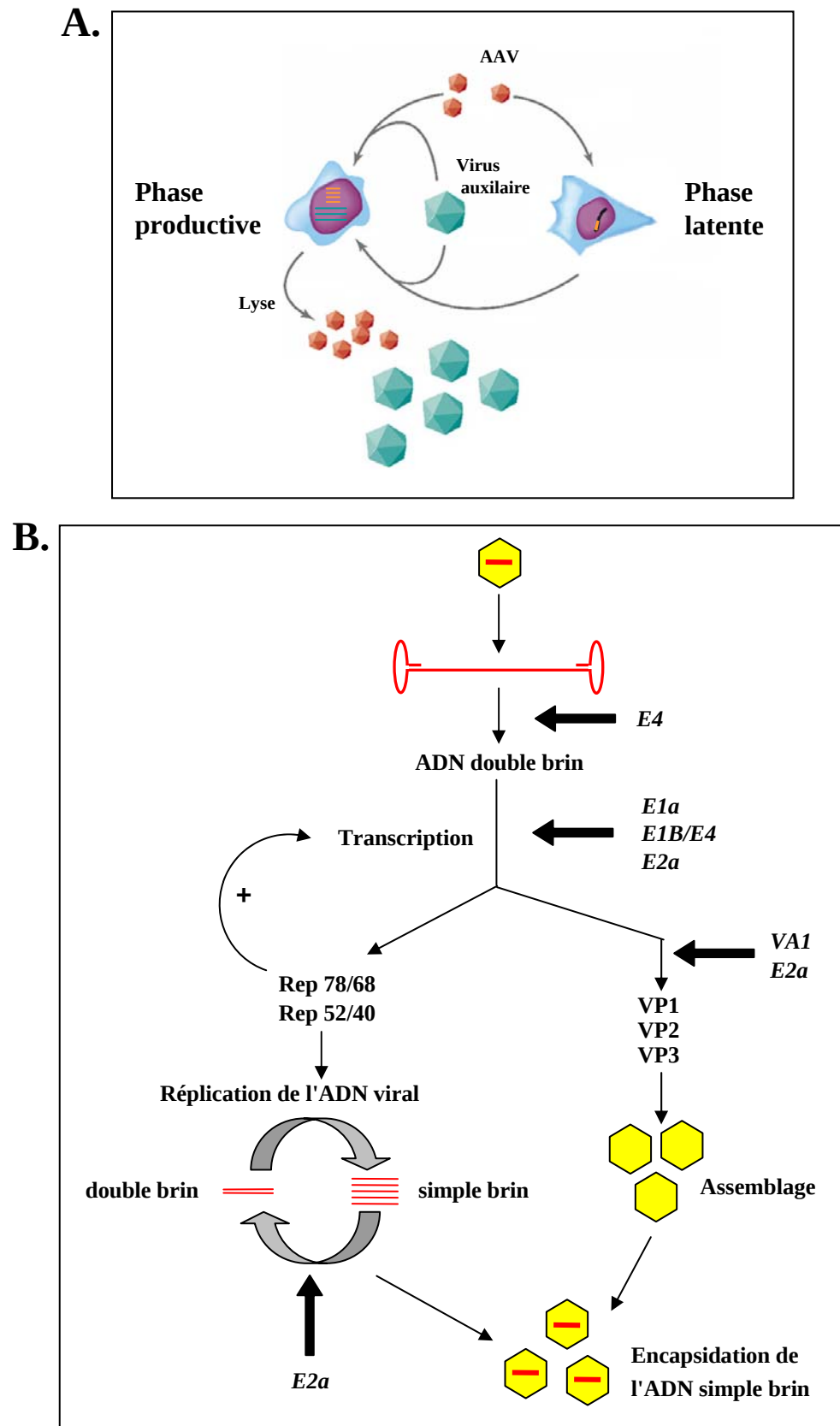


Figure 5 : Cycle viral de l'AAV

A. Représentation schématique du cycle viral de l'AAV. En l'absence de virus *helper*, l'infection des cellules par l'AAV2 conduit à une phase de latence qui se caractérise par l'absence d'expression des gènes *rep* et *cap* et l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. En présence d'un virus *helper* (adénovirus, herpesvirus), la co-infection ou la mobilisation du génome viral constitue la phase productive, caractérisée par l'expression des gènes de l'AAV, la réplication du génome et son encapsidation au niveau nucléaire. Les virions néoformés sont libérés dans le milieu extérieur après lyse cellulaire provoquée par le virus *helper*. **B. Cycle réplcatif de l'AAV2 (d'après Salvetti, 1999).** Le schéma détaille les événements cellulaires de la phase productive. L'ensemble du cycle réplcatif se déroule au niveau nucléaire et nécessite la présence de facteurs *helper*. Les flèches en gras indiquent les protéines adénovirales qui ont un effet *helper*.

En l'absence d'adénovirus, les trois promoteurs de l'AAV sont silencieux. Ils sont réprimés en trans par la fixation des protéines Rep 78 et 68 sur le site RBS (*Rep Binding Site*) du p5 (Pereira et al., 1997). Ce site se situe juste après la boîte TATA, nécessaire à l'initiation de la transcription. La fixation des Rep 78 et 68 pourrait alors empêcher la fixation du facteur de transcription TFIID et/ou de la *TATA-binding protein* (TBP) sur la boîte TATA, réprimant ainsi le p5 (McCarty et al., 1994) (Pereira et al., 1997). Toutefois, une synthèse basale des protéines Rep est supposée pour exercer la répression du p5. La répression des gènes de l'AAV est également renforcée par les facteurs cellulaires ZF5 (Cathomen et al., 2001) et YY1 (*Ying Yang 1*) (Shi et al., 1991). Ce dernier possède un domaine de fixation, en position (-60) par rapport au site d'initiation de la transcription, contigu au site de fixation du MLTF (*Major Late Transcription Factor*). Un site de fixation de YY1 est également présent en position (+1).

En présence d'adénovirus, la protéine E1A trans-active le promoteur p5 (Chang et al., 1989) en favorisant la fixation du facteur cellulaire MLTF (Lewis et al., 1995) (Shi et al., 1991). Les promoteurs p19 et p40 sont trans-activés à leur tour par les protéines Rep 68 et Rep 78. L'activité trans-répressive de ces protéines est cependant maintenue en présence d'adénovirus (Pereira et al., 1997). Le promoteur p19 serait transactivé par les facteurs cellulaires cAAP (*cellular AAV activating protein*) et SP1 (Pereira and Muzyczka, 1997), fixé en amont de la TATA Box du p19 (Lackner and Muzyczka, 2002). Les Rep 78 et 68 fixées sur le RBS de l'ITR ont un rôle transactivateur sur le p19, vraisemblablement par formation d'une structure secondaire et interaction avec SP1 (Lackner and Muzyczka, 2002).

Il faut toutefois noter l'activité *helper* des autres protéines adénovirales, notamment E2A (DBP : *DNA Binding Protein*) qui stimule l'étape de transcription (Chang and Shenk, 1990), les protéines précoces E1B (55kDa) et E4 (ORF6) qui interviennent dans le transport des ARNm de l'AAV (Samulski and Shenk, 1988) et les ARN VA1 qui favorisent l'étape de traduction (Schneider et al., 1984) (voir fig. 5.B « Cycle réplcatif de l'AAV-2 »).

c. Devenir du génome viral dans la cellule

➤ En l'absence d'adénovirus

Comme présenté plus haut, la phase de latence se caractérise par l'intégration de l'AAV sauvage au niveau d'un locus précis du chromosome 19 (site 19q13.3ter), appelé AAVS1 (Kotin et al., 1992). Cette région comprend un site RBS (*Rep Binding Site*) semblable à celui trouvé dans les ITR. L'AAV est le seul virus connu à s'intégrer dans un site précis du génome. L'AAVS1 serait proche, dans les cellules musculaires humaines, du gène TNNT1 codant pour la troponine T (Dutheil et al., 2000) (Dutheil et al., 2004). Pourtant, de nombreux sites RBS ont été identifiés au sein du génome humain (Wonderling and Owens, 1997). On pouvait dès lors s'interroger sur le mécanisme responsable de l'intégration spécifique du génome viral sauvage au niveau du chromosome 19. Celle-ci est due à la présence d'un site trs (*Terminal Resolution Site*) (Young et al., 2000) (Meneses et al., 2000), comparable à celui identifié dans les ITR.

Dans une série de publications en 1996, M. Linden et al (Linden et al., 1996a) (Linden et al., 1996b) présentent un modèle d'intégration faisant intervenir les protéines Rep 78/68 (voir Figure 6.1 : "Modèle d'intégration du génome AAV sauvage au niveau du site AAVS1"). Il proposait que l'ADN viral sous forme circulaire double brin, après fixation des protéines Rep 78/68 sur le site RBS d'un ITR, s'associe, par l'intermédiaire de ces mêmes protéines au niveau du RBS du site AAVS1. Celles-ci clivent alors l'AAVS1 au niveau de son trs et les polymérases cellulaires assurent la synthèse d'ADN à partir du site de coupure. Le modèle se basait sur des sauts (« switch ») de l'ADN polymérase à la faveur du déplacement du brin d'ADN clivé, créant une inversion des séquences AAVS1 amplifiées. Cette réplication peut aboutir à la formation de concatémères, détectés dans les formes intégrées de génomes AAV (Giraud et al., 1995). Au cours de ce processus d'intégration, la protéine Rep 78 sert de ligase entre les ADN cellulaire et viral (Smith and Kotin, 2000) (Surosky et al., 1997). Les protéines Rep apparaissent alors comme des composants indispensables à l'intégration du génome viral. C'est sans doute pour cela que le rendement d'intégration de l'AAVr s'en voit diminué. Par ailleurs, une étude *in vitro* semble indiquer que le site trs de l'ITR n'est pas directement nécessaire au phénomène d'intégration du génome AAV, mais plutôt à la mobilisation de ce

génomé intégré (Young and Samulski, 2001). Toutefois, il a été montré récemment que le rendement et la spécificité d'intégration de l'AAVr dans l'AAVS1 étaient augmentés en présence d'une séquence de 138 paires de bases interne au p5, baptisée p5IEE (*p5 Integration Efficient Element*) (Philpott et al., 2002a) (Philpott et al., 2002b). En sa présence, le rendement d'intégration atteint celui de l'AAV sauvage. Le rôle des ITR dans le processus d'intégration est même complètement remis en cause puisque ces résultats sont reproduits en leur absence (Philpott et al., 2002b).

Un modèle récent (Hamilton et al., 2004) suppose une recombinaison entre l'AAVS1 et le p5 de l'AAV par interaction d'hexamères de Rep fixés sur les RBS de l'AAVS1 et du p5 (voir Figure 6.2 page suivante : "Modèle d'intégration du génome AAV sauvage au niveau du site AAVS1"). L'AAVS1 serait amplifié par des successions de coupure spécifique par Rep au niveau du trs de l'AAVS1 et d'amplification par une polymérase cellulaire (Hamilton et al., 2004).

➤ En présence d'adénovirus

A la faveur d'une infection ultérieure par un adénovirus, le génome viral est excisé (étape de mobilisation, ou "*rescue*"). Il y aurait reconnaissance des sites RBS des ITR par les protéines Rep dont la synthèse est induite par le virus auxiliaire, entraînant la coupure au niveau du site trs adjacent. Le génome peut alors être répliqué pour former de nouvelles particules infectieuses (étape d'infection productive, phase répllicative ou cycle lytique).

Si l'infection par un adénovirus s'effectue en même temps que l'infection par l'AAV (co-infection), le génome AAV simple brin est tout d'abord converti en ADN double brin, qui sert de substrat à la synthèse des protéines Rep et Cap, dont l'expression dépend des protéines virales et cellulaires. La présence de l'adénovirus permet aussi d'initier la réplication, aboutissant à la formation de nouveaux génomes AAV simple brin et la formation de nouvelles particules infectieuses.

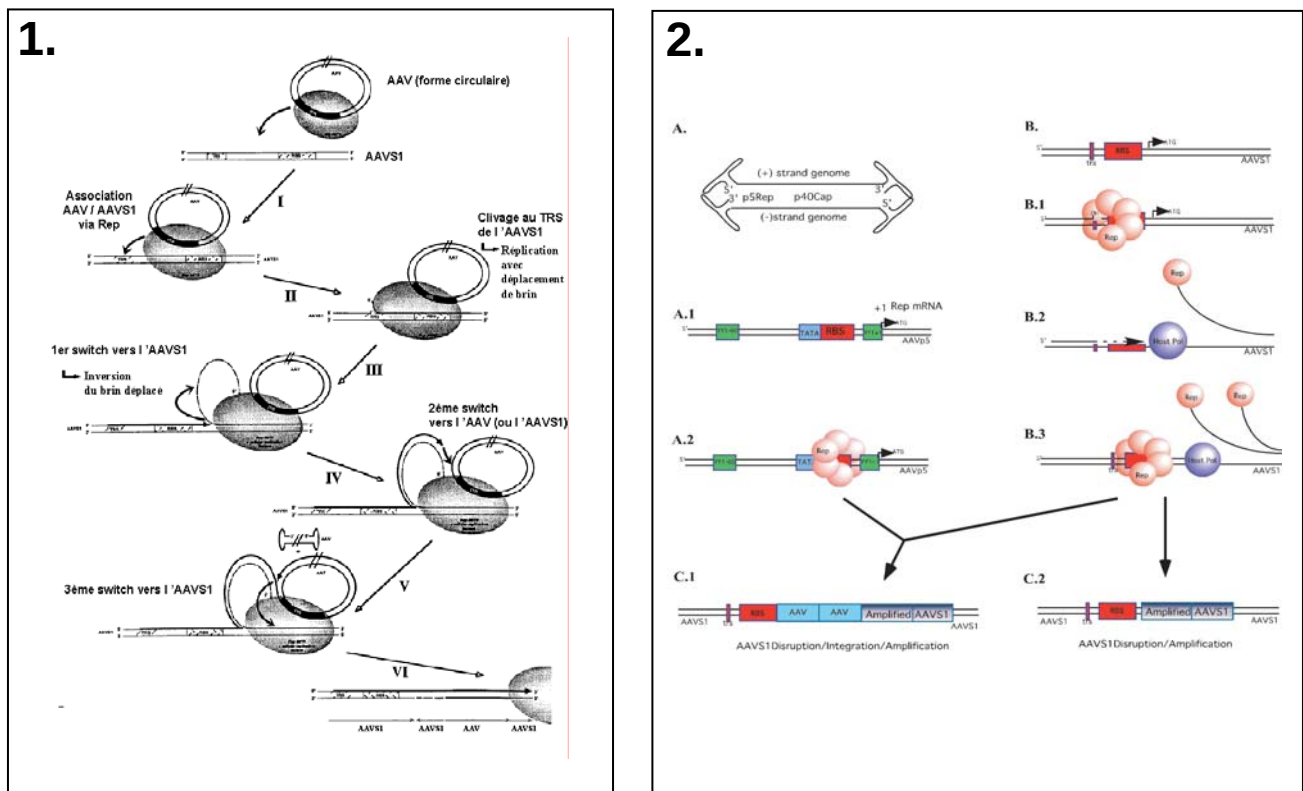


Figure 6 : Modèles d'intégration du génome AAV sauvage au niveau du site AAVS1

1. Modèle proposé par Linden et al. (1996). L'ADN viral sous forme circulaire double brin, après fixation des protéines Rep 78/68 sur le site RBS (*Rep Binding Site*) d'un ITR, s'associe, par l'intermédiaire de ces mêmes protéines au niveau du RBS du site AAVS1 (Etape I). Celles-ci clivent alors l'AAVS1 au niveau de son trs (*terminal resolution site*) (Etape II). Les polymérase cellulaires assurent la synthèse d'ADN à partir du site de coupure. Cette synthèse s'accompagne du déplacement du brin d'ADN clivé. A la faveur de ce déplacement, les polymérase cellulaires vont effectuer un saut ("switch") sur le brin déplacé qui va servir de brin matrice, créant une inversion de la séquence AAVS1 (Etape III). L'ADN polymérase effectue alors un second saut, prenant l'ADN viral comme brin matrice (Etape IV). Ce second "switch" aboutit à une inversion. La réplication du génome de l'AAV, maintenant lié à l'AAVS1, peut être initiée, jusqu'à ce qu'un troisième déplacement de brin permette un retour vers l'AAVS1 (Etape V). La dernière étape s'accompagne de phénomènes de réparation de l'ADN (Etape VI).

2. Modèle proposé par Hamilton et al. (2004). Ce modèle a pour avantage de détailler les phénomènes moléculaires au niveau des génomes viral et cellulaire. (A) Représentation du génome de l'AAV avec les ITR sous forme repliée. A.1 : élément d'intégration minimal du p5 incluant le site RBS, les sites de fixation du facteur cellulaire YY1 et la TATA box. A.2 : les Rep 78/68 se fixent sous forme d'hexamères sur le site RBS du p5. (B) Représentation schématique de l'AAVS1, incluant le site RBS et le site trs nécessaire à l'activité endonucléase spécifique de Rep. B1 à B3 : les Rep s'associent sous forme d'hexamères au niveau du site RBS de l'AAVS1 et clivent l'ADN au niveau du site trs. Il faut remarquer que Rep reste liée de façon covalente à l'extrémité 5' du brin clivé. Après coupure, l'AAVS1 est répliqué par une polymérase cellulaire. (C) C.1 : il se peut que des cycles de clivage spécifique par Rep / réplication de l'AAVS1 expliquent l'amplification de la séquence AAVS1. C.2 : l'intégration du génome viral au niveau du génome cellulaire ouvert résulte de la recombinaison entre l'AAVS1 (B.3) et le p5 (A.2) médiée par Rep (C.1).

d. Réplication et encapsidation du génome de l'AAV : formation de particules virales

➤ Réplication

Les éléments impliqués dans la réplication du génome de l'AAV sont les ITR, les protéines Rep et les protéines adénovirales.

Les ITR, décrits plus hauts, comportent chacun un site RBS (*Rep Binding Site*) de fixation de Rep et un site de coupure trs (*Terminal Resolution Site*). Il est intéressant de noter que l'on trouve aussi un site RBS dans certains promoteurs viraux ou cellulaires (Wonderling and Owens, 1997).

Le mécanisme de réplication est propre aux parvovirus et dérivé du modèle de réplication par cercle roulant proposé pour la réplication des bactériophages. La première étape est la conversion du génome simple brin en double brin (voir Figure 7 page suivante : "Schéma général de la réplication de l'AAV-2"). Les ITR fonctionnent comme des origines de réplication. L'extrémité 3' de l'ITR gauche peut servir d'amorce pour l'initiation de la synthèse d'ADN par une ADN polymérase cellulaire, dans le sens 5' vers 3'. Cette étape correspond à une forme dimérique dont l'une des extrémités comporte un ITR complètement fermé. Les protéines Rep 78/68 provoquent la coupure de cet ITR par leur fixation sur le RBS et leur activité endonucléase au niveau du trs adjacent, puis permettent le déploiement de l'ITR par leur activité hélicase, ce qui permet de finir la conversion du simple brin en double brin, transcriptionnellement actif. Le mécanisme mis en jeu aboutit à l'inversion des ITR. Le repliement des ITR aboutit à la formation de deux ADN simple brin, pouvant soit subir un nouveau cycle de réplication, soit être encapsidé.

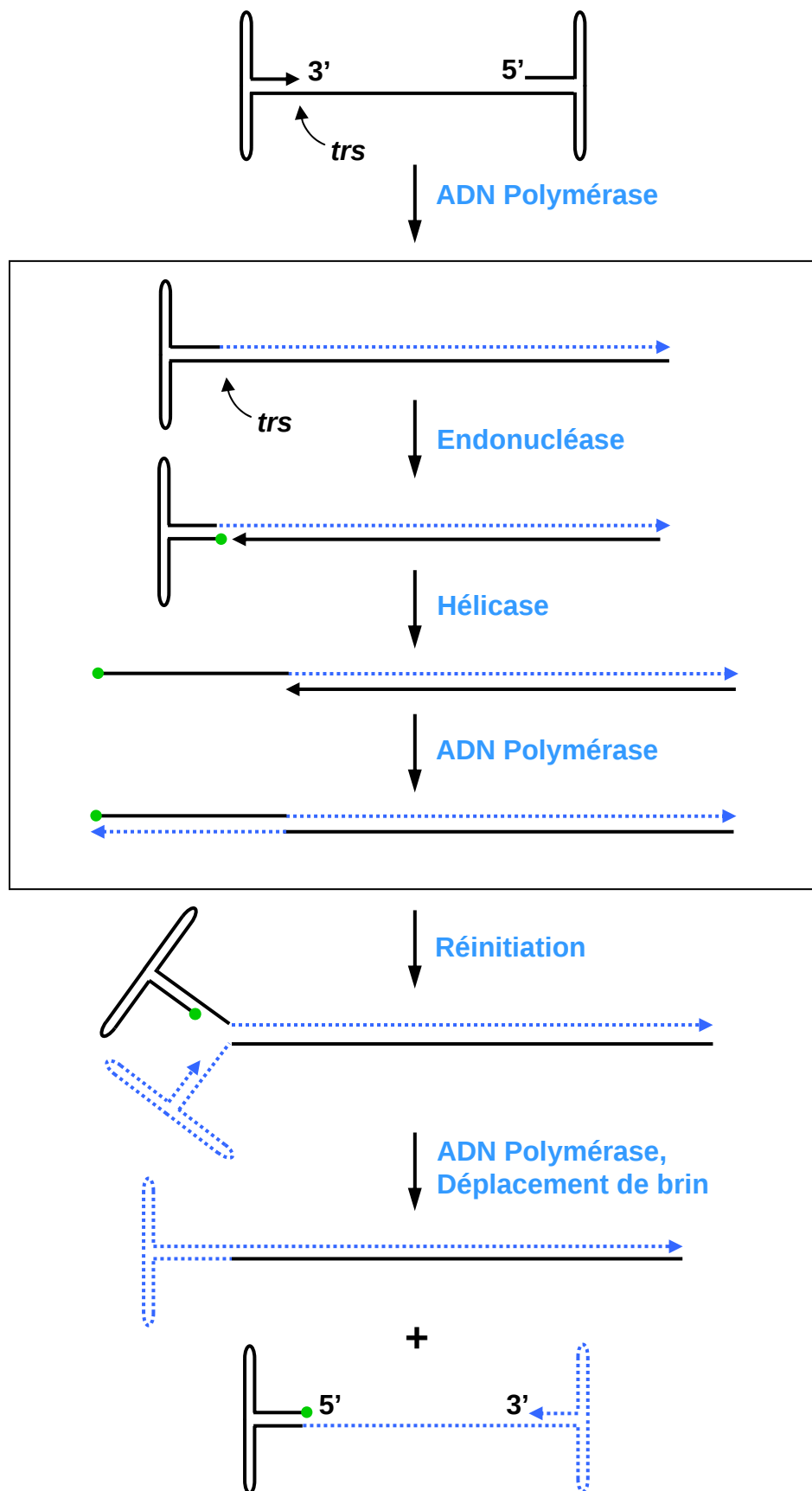


Figure 7 : Schéma général de réplication de l'AAV-2

Les flèches (→) représentent l'extrémité 3'-OH libre. Le site trs (*terminal resolution site*) de l'ITR 3' est indiqué par une flèche. Les protéines Rep 78/68 fixées au niveau du RBS (*Rep Binding Site*) sont figurées par un disque vert (●). Les brins néosynthétisés sont représentés en pointillés bleus.

➤ Assemblage de particules

La capside de l'AAV forme une particule icosaédrique de 20 à 24 nm de diamètre. Elle est constituée des protéines VP1, VP2 et VP3 dont l'expression est sous la dépendance du promoteur p40. Celui-ci serait activé en présence de virus auxiliaire. Le mécanisme mis en jeu n'est pas clairement démontré mais ferait intervenir, comme pour les autres promoteurs, la fixation des protéines Rep 78/68 sur un site RBS de p40.

L'assemblage des particules, ou tout du moins l'encapsidation du génome, se fait dans le noyau. Les travaux de Ruffing et al (Ruffing et al., 1994) ont montré que la formation de capsides vides est dépendante de la présence de VP2. Ils ont en outre montré que les trois protéines VP, lorsqu'elles étaient coexprimées, se localisaient exclusivement dans le noyau. De plus, VP2 posséderait un signal de localisation nucléaire dans sa partie N-terminale (Hoque et al., 1999).

➤ Mécanisme d'encapsidation

Après infection de cellules par de l'AAV sauvage, les protéines rep et cap et le génome sont colocalisés dans le noyau (Hunter and Samulski, 1992) (Wistuba et al., 1997). En l'absence des protéines Rep 52/40, on peut observer une diminution notable du nombre de particules infectieuses (Ni et al., 1994). Les protéines Rep 52/40 participeraient, grâce à leur activité hélicase, à l'encapsidation des génomes AAV issus de la réplication.

Certains résidus auraient une importance dans le processus d'encapsidation. La mutation du résidu Arginine 459 de VP3 diminue la ratio capsides pleines / capsides vides (Opie et al., 2003). Le résidu Histidine 358 aurait un rôle dans la stabilité de la capside (Opie et al., 2003). La mutation du résidu Arginine 432 conduit à la production de particules vides (Wu et al., 2000).

Le caractère défectif de l'AAV, son organisation génomique simple, sa persistance après l'infection et sa capacité à infecter des cellules quiescentes sont autant de propriétés qui ont favorisé son développement comme vecteur en transfert de gènes.

1.3 L'Adeno-Associated Virus recombinant (AAVr) développé comme vecteur en transfert de gènes

1.3.1 Production de particules d'AAVr

Nous exposerons d'abord les méthodes de production des vecteurs dérivés de l'AAV-2, avant d'envisager celle des autres sérotypes.

a. Production des vecteurs de sérotype 2

L'AAVr dérive de l'AAV sauvage : les gènes rep et cap sont remplacés par le transgène associé aux éléments nécessaires à la régulation de son expression (un promoteur et un signal de polyadénylation), encadré par les deux ITR qui sont les seules séquences virales conservées. La taille du vecteur, ITR comprises, ne peut dépasser de beaucoup celle du virus sauvage, ce qui laisse environ 4,6 kb de séquence à insérer (voir Figure 8 page suivante : "Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr)"). Au-delà de cette taille, l'ADN inséré est souvent incomplet ou le rendement de production diminué (Dong et al., 1996).

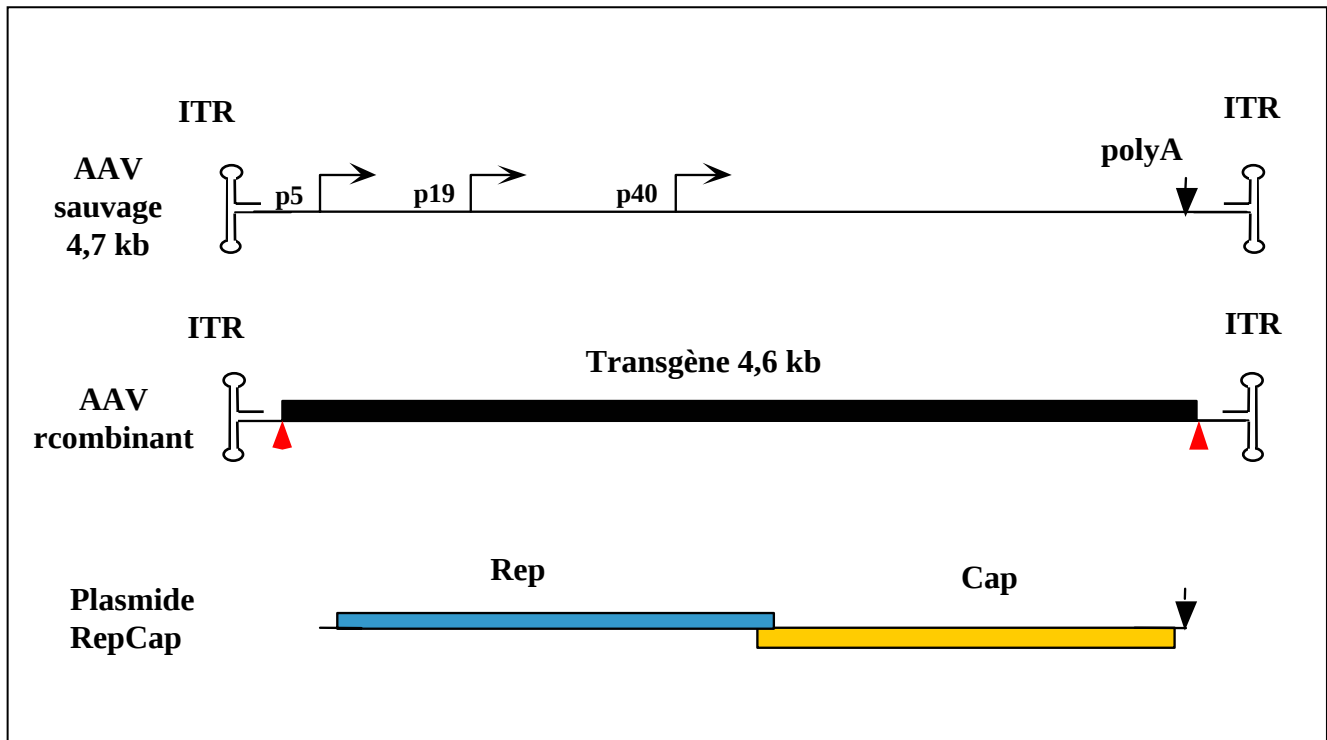


Figure 8 : Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr)

Le génome des vecteurs (AAVr) est obtenu en remplaçant les gènes *rep* et *cap* de l'AAV par la cassette d'expression du transgène. Les seules séquences virales conservées sont les ITR qui sont nécessaires en cis à la réplication et à l'encapsidation du génome recombinant lors de la phase de production. Les fonctions transcomplémentantes sont alors apportées par un plasmide *rep-cap* délété des séquences ITR.

Les ITR sont les éléments requis en *cis* pour la réplication et l'encapsidation. Lors de la production de vecteurs les fonctions Rep et Cap sont apportées en *trans* par un plasmide.

Classiquement, les vecteurs AAVr sont produits dans des cellules permissives (lignée cellulaire 293 dérivée de cellules embryonnaires rénales, exprimant de façon stable la région E1 de l'adénovirus) cotransfectées par le plasmide vecteur et le plasmide Rep-Cap et infectées par un adénovirus sauvage ou délété de la région E1 (voir Figure 9 : « Production de vecteurs AAVr »). La construction Rep-Cap qui a été couramment utilisée, dépourvue d'ITR, véhicule les gènes Rep et Cap sous le contrôle de leurs promoteurs natifs (p5 et p19 pour le gène rep, p40 pour le gène cap). Afin de réduire la contamination des préparations virales en adénovirus, les fonctions *helper* peuvent être apportées en transfection par un plasmide adénoviral (Salveti et al., 1998) (Xiao et al., 1998), permettant de supprimer l'effet cytopathique dû à l'infection adénovirale, ce qui simplifie la méthode de production en augmentant le rendement de production et limitant la fuite des particules produites dans le milieu de culture. Les méthodes actuelles font appel à un plasmide pDG (Grimm et al., 1998) véhiculant les gènes Rep et Cap ainsi que les gènes E2 (codant pour la *DNA Binding Protein*), E4 et VA1 adénoviraux. L'utilisation de ce plasmide permet de limiter la manipulation des cellules en remplaçant un protocole de tri-transfection par une cotransfection. Le promoteur fort p5 des Rep 78/68 est ici remplacé par le promoteur LTR du MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Même si, a priori, la quantité de Rep 78/68 synthétisée est plus faible, la réplication du plasmide vecteur n'est apparemment pas diminuée puisque le rendement de production est même plus élevé comparé aux protocoles de tri-transfection (Grimm et al., 1998).

La purification des stocks d'AAVr se fait après lyse du culot cellulaire par action de détergents ou de nucléases (Gao et al., 2000) (Clark et al., 1999) ou par succession de cycles congélation/décongélation (Zolotukhin et al., 1999) (Salveti et al., 1998) (Brument et al., 2002). La purification des lysats cellulaires s'effectuait classiquement par ultracentrifugation sur gradient de Chlorure de Cesium (CsCl) (Salveti et al., 1998). L'affinité de l'AAV-2 pour les groupements héparan sulfate a permis d'utiliser des protocoles de chromatographie sur colonne d'héparine. La combinaison d'une ultracentrifugation sur gradient de densité d'iodixanol (pour éliminer les contaminants cellulaires) suivie par une purification des particules sur colonne d'héparine permet d'obtenir des lots plus purs qu'une double purification sur gradient de CsCl (Zolotukhin et al., 1999) (Brument et al., 2002). On juge

classiquement de la pureté des suspensions virales par une coloration des protéines au nitrate d'argent après migration sur gel de SDS.

L'utilisation des vecteurs *in vitro* ou *in vivo* implique de connaître précisément les quantités injectées. La titration des préparations virales utilise en routine plusieurs techniques :

- Le dot blot qui permet de connaître le nombre de particules pleines par mL. Il repose sur la quantification de l'ADN viral encapsidé, en comparaison avec des quantités connues du plasmide vecteur.
- Le RCA (*Replication Center Assay*) qui permet de déterminer le nombre de particules infectieuses par mL. Il est basé sur la mesure de la réplication du vecteur en présence d'adénovirus et de Rep. Anciennement, les fonctions Rep étaient apportées par infection d'AAV sauvage (McLaughlin et al., 1988). Le protocole a été modifié par la suite (Salvetti et al., 1998) : il utilise des cellules exprimant de façon constitutive le gène rep (clone stable de cellules HeLa possédant une à deux copies du génome rep-cap de l'AAV-2 délété des ITR, (Chadeuf et al., 2000)). Après resuspension, les cellules sont transférées sur membrane puis lysées. L'hybridation avec une sonde spécifique de l'ADN encapsidé permet de détecter l'ADN amplifié par réplication. La technique repose sur la réalisation de dilutions limites pour infecter les cellules HeLa à une faible MOI. On considère alors qu'un spot après hybridation correspond à un événement d'infection et matérialise une particule infectieuse. Au-delà des variabilités de rendement d'une préparation à l'autre, on retrouve un rapport d'un à deux log entre la quantité de particules pleines et le nombre de particules infectieuses (Salvetti et al., 1998).
- Une autre technique de titration est basée sur la détermination du nombre de cellules transduites. Ceci peut être fait en routine sur des préparations véhiculant un gène marqueur pour lesquels il est possible de détecter, en présence d'adénovirus, le produit d'expression du transgène (GFP en microscopie électronique, β -Galactosidase après coloration). Pour ces deux exemples, les titres sont exprimés en « GFU » (*GFP forming unit*) ou « LFU » (*LacZ forming unit*).

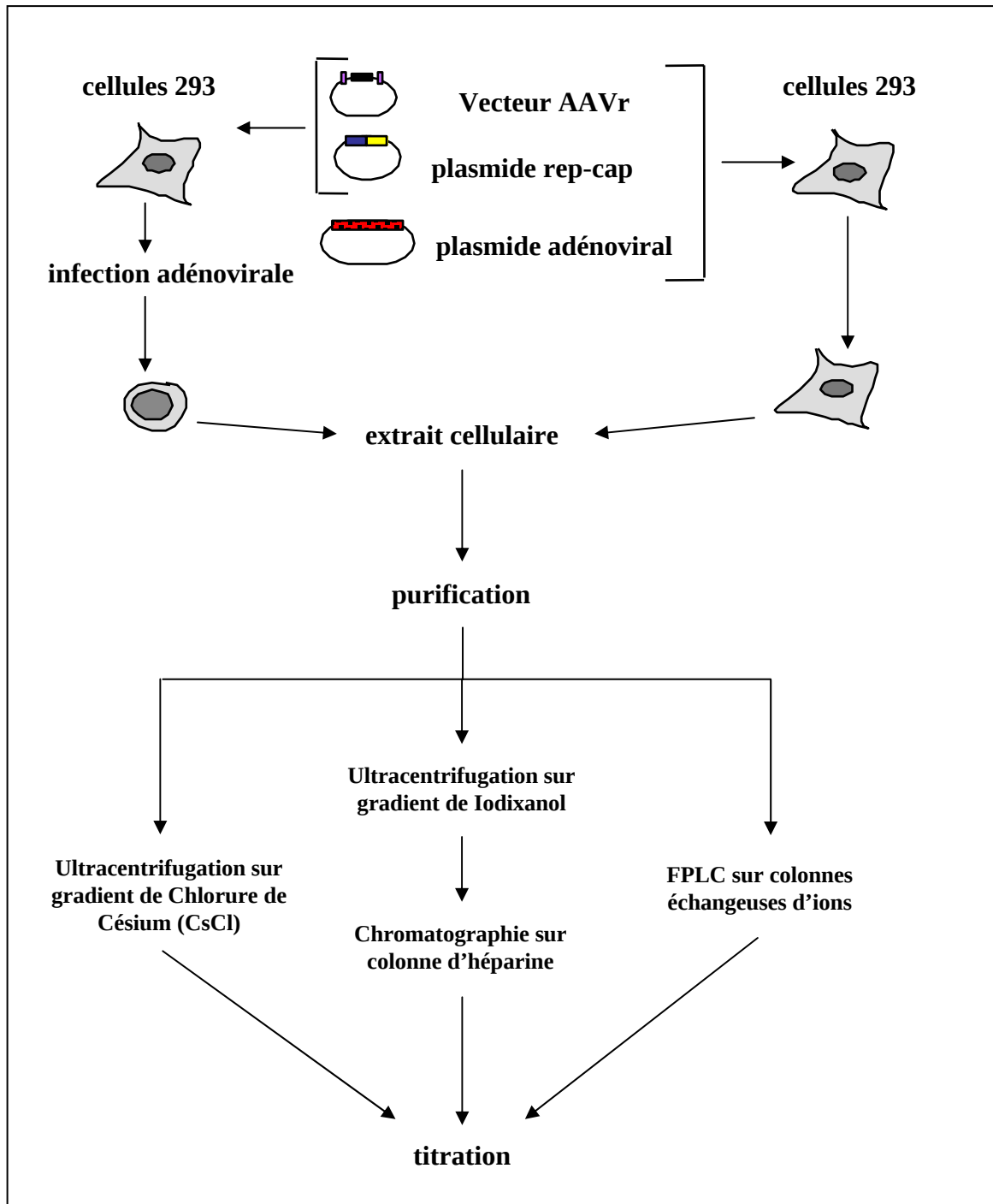


Figure 9 : Production de vecteurs AAVr (d'après Salvetti et al., 1998)

Classiquement les cellules 293 sont transfectées au moyen du plasmide vecteur et d'un plasmide transcomplémentant apportant les gènes *rep-cap*. Les gènes auxiliaires adénoviraux sont soit apportés par infection adénovirale (voie de gauche), soit par transfection d'un plasmide adénoviral (voie de droite), ou d'un plasmide comportant les gènes *rep-cap* et *helper* adénoviraux (non représenté). Le schéma ne figure pas de production à partir de lignées stables. Après récolte et lyse des cellules, l'extrait cellulaire est purifié sur gradient de densité ou chromatographie FPLC.

Le titre des préparations est déterminé en nombre de particules infectieuses (RCA, *Replication Center Assay*, Salvetti et al., 1998) ou de génome encapsidé (dot blot notamment, Salvetti et al., 1998).

Ces méthodes de titration permettent de comparer des préparations virales d'un même sérotype. Pour des préparations de vecteurs de sérotypes différents, les méthodes basées sur des infections (RCA et GFU/LFU) perdent leur intérêt, puisque l'affinité propre à chaque sérotype pour un type cellulaire donné (Rabinowitz et al., 2002) introduit un biais. Il faut alors se baser sur le nombre de génomes encapsidés. Certains laboratoires obtiennent ce titre par PCR quantitative.

L'absence de contamination des préparations en particules AAV sauvage est vérifiée par RCA sur des cellules HeLa témoin (n'exprimant pas Rep) en présence d'adénovirus. Les contaminations en virus sauvage sont à l'heure actuelle limitées.

Par contre, plusieurs groupes ont rapporté la contamination des préparations d'AAVr par des particules « Rep-positives » à hauteur de 0,1 à 1% (Allen et al., 1997) (Nony et al., 2003) (Salveti et al., 1998) (Wang et al., 1998). Des contaminations par Cap sont également observées. Toutefois ces contaminants ne sont pas des particules infectieuses car n'induisent pas de signal en RCA (Nony et al., 2003). Une des hypothèses serait la réplication de la séquence rep-cap (séquence intégrée dans les cellules HeLa ou après transfection plasmidique) à partir de la séquence CARE de Rep (Nony et al., 2001), (Tullis and Shenk, 2000) en présence d'adénovirus selon un modèle de cercle roulant. Après coupure par Rep, ces séquences pourraient s'encapsider en l'absence d'ITR (Nony et al., 2003).

Le groupe d'Anna Salvetti rapporte également la détection de séquences encapsidées d'origine procaryote (gènes de résistances aux antibiotiques) comme contaminant des préparations de vecteurs (Chadeuf et al, soumis). Ces séquences proviendraient majoritairement du *backbone* du plasmide vecteur. Elle sont de plus détectées à long terme après transfert de gène chez l'animal. Les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés. Ces observations font suite à deux études précédentes qui montraient la présence de séquences procaryotes (Miller et al., 2002) et de jonctions entre le génome de l'AAV et le site AAVS1 dans des préparations d'AAV sauvage et recombinant (Huser et al., 2003).

b. Production des sérotypes autres que l'AAV-2

La Production des sérotypes autres que l'AAV-2 passe par des méthodes de pseudotypage (Rabinowitz et al., 2002) (Chiorini et al., 1999) (Grimm et al., 2003a). Les AAVr obtenus sont des vecteurs chimères, possédant les ITR de l'AAV-2 et les VP des sérotypes voulus (1 à 9 dans la littérature (Gao et al., 2004b)). Les protocoles actuels développés par le groupe de Jude Samulski (Rabinowitz et al., 2002) font appel, comme présenté précédemment, à une tritransfection de cellules 293 : i) le plasmide vecteur comportant les ITR de l'AAV-2, conservé quel que soit le sérotype que l'on veut produire, ii) un plasmide adénoviral dérivé du pXX6 et iii) un plasmide helper apportant les fonctions Rep et Cap, propre à chaque sérotype. La conservation des ITR de l'AAV-2 tient au fait que la biologie des vecteurs de sérotype 2 est connue et que, surtout, la production avec les ITR d'AAV-5 en présence de Rep d'AAV-2 est peu efficace (perte de 4 à 5 log) (Rabinowitz et al., 2002) (Chiorini et al., 1999). Il faut noter que les ITR d'AAV-5 n'ont que 58% d'homologie avec ceux d'AAV-2 (Chiorini et al., 1999).

La technique présentée par le groupe de Jude Samulski en 2002 a été une des premières méthodes décrite (Rabinowitz et al., 2002). Nous détaillons particulièrement cette méthode car elle a servi à la production de la quasi-totalité des vecteurs que nous avons utilisés. Les plasmides helper utilisés, dénommés pXR1 à 5 (voir Figure 10 page suivante : « Production de vecteurs pseudotypés de sérotypes 1 à 5 ») véhiculent le gène cap propre à chaque sérotype et tout ou partie du gène rep de l'AAV-2 dont l'ATG du p5 est muté en ACG. Cette modification permet d'augmenter le rendement de production en réduisant la quantité de Rep 78/68 produite et en augmentant l'expression de cap (Li JVirol 1997). L'insertion de séquences homologues en 3' de rep est nécessaire pour conserver le rendement de production pour les sérotypes 3, 4 et 5. Pour ces trois sérotypes, les plasmides *helper* ne contenant aucune séquence spécifique de chaque sérotype en 5' des VP donnent des rendements de production 10 à 100 fois inférieurs.

Cette méthode de production permet non seulement d'obtenir des titres quasiment équivalents pour les sérotypes 1, 3, 4 et 5, mais surtout de produire des vecteurs dont les propriétés de transduction sont dues uniquement à la capsid.

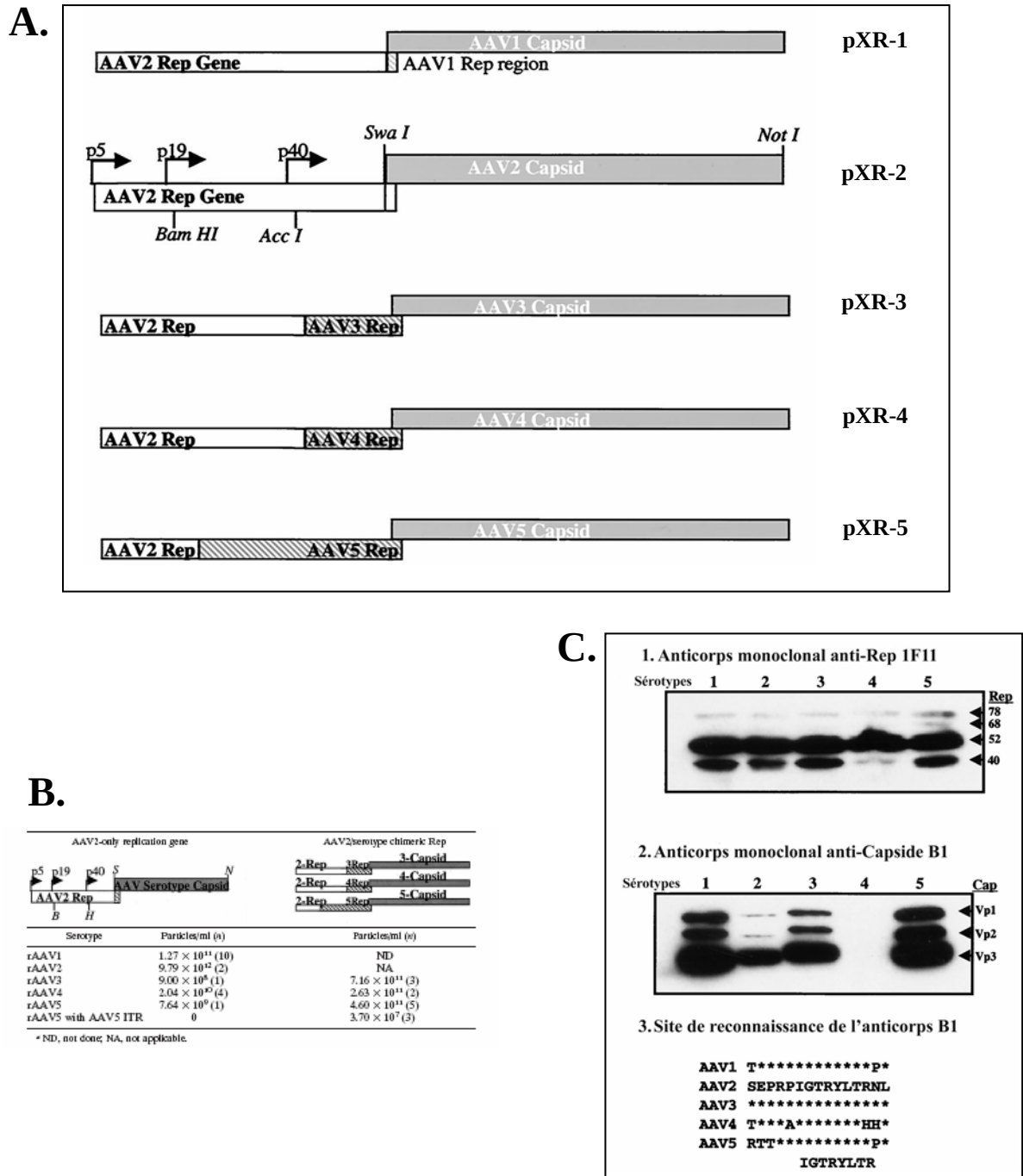


Figure 10 : Production de vecteurs pseudotypés de sérotypes 1 à 5 (d'après Rabinowitz et al., 2002).

A. Représentation schématique des plasmides *helper* pXR-1 à -5. Les séquences conservées codant pour l'extrémité N terminale des Rep sont figurées en blanc, les séquences insérées codant pour les extrémités C terminales des Rep pour chaque sérotype sont représentées en hachuré. Les séquences codant pour les protéines de capsid sont figurées en gris. **B. Comparaison des rendements de production** à l'aide de plasmides *helper* contenant la totalité de la séquence codante de Rep de l'AAV-2 (schéma de gauche) ou une séquence chimère (pXR-3, -4 et -5, schéma de droite). **C. Western blot réalisés sur des lysats cellulaires** 24h après tri-transfection de cellules 293. Chaque puits est chargé avec 5 µg de protéines totales. Les plasmides *helper* spécifiques de chaque sérotype sont indiqués au-dessus de chaque blot, incubés avec l'anticorps monoclonal anti-Rep 1F11 (1) ou l'anticorps monoclonal anti-Cap B1 (2). Le poids moléculaires des Rep et les sous-unités Cap sont indiqués sur la droite des blots. Les capsides d'AAV-4 ne sont pas reconnues par l'anticorps B1. Le site de reconnaissance de cet anticorps est représenté en bas de la figure et aligné avec la séquence d'acides aminés de cette région des 5 sérotypes. Les astérisques indiquent les résidus conservés par rapport à l'AAV-2.

En raison de l'affinité différente de chaque sérotype pour l'héparine, la purification passe à l'heure actuelle par ultracentrifugation sur chlorure de césium.

c. Avancées dans le domaine de la production et de la purification de vecteurs

Les laboratoires ont amélioré ces dernières années les méthodes de production et de purification des vecteurs. En effet, dans l'optique de produire des lots cliniques, il est indispensable i) d'adapter les protocoles de production à grande échelle et ii) de maîtriser la pureté des préparations virales.

La production à partir de lignées d'encapsidation (Blouin et al, manuscrit en cours de rédaction) permettra sûrement d'adapter les méthodes de production à plus grande échelle :

- d'une part parce que les rendements de production sont au moins égaux voire supérieurs aux protocoles de transfection (Chadeuf et al., 2000). Après infection adénovirale, le nombre de copies de rep-cap présentes dans les clones stables HeLaRC32 est multiplié par 100 et comparable au nombre de copies après transfection d'un plasmide rep-cap (Chadeuf et al., 2000) (Tessier et al., 2001). Cette amplification en l'absence d'ITR est due à une séquence de Rep englobant le p5, baptisée CARE (*Cis-Acting Replication Element*) (Nony JVirol 2001, Tessier JVirol 2001). Il faut toutefois noter que ces résultats ne sont pas reproduits après transfection d'un plasmide adénoviral (Chadeuf et al., 2000). De plus, l'obtention de lignées stables à partir de cellules 293 est difficile, peut-être du fait de l'expression de rep et cap induite par E1 (Salvetti, non montré).
- d'autre part parce qu'elles limitent les manipulations ; la production à partir d'une lignée cellulaire stable ayant intégré rep et cap ainsi qu'un plasmide vecteur nécessite la seule infection par un virus auxiliaire. Un virus non réplcatif dérivé du virus Herpes Simplex donne même des rendements de production supérieurs à un infection adénovirale (Toublanc et al., 2004).

Les efforts se sont également portés ces dernières années sur la mise au point de méthodes de purification par FPLC (Gao et al., 2000) (Chiorini et al., 1999) (Auricchio et al., 2001)

(O'Riordan et al., 2000) (Clark et al., 1999) (Kaludov et al., 2002) (Brument et al., 2002) (pour revue, voir (Blouin et al., 2004)). Le groupe d'Anna Salvetti présente une méthode originale basée sur l'utilisation de colonnes échangeuses d'ions, et non d'héparine, qui la rendrait *a priori* applicable aux différents sérotypes. La lyse du culot cellulaire par congélation/décongélation n'induit pas d'étape de prépurification. L'utilisation successive d'une colonne échangeuse de cations et d'une colonne échangeuse d'anions donne des préparations d'AAV-2 et -5 plus pures qu'après purification sur double chlorure de césium ou après iodixanol/héparine. Appliquée à la production sur lignées cellulaires, cette méthode serait applicable dans le cadre des pratiques GMP (*Good Manufacturing Practices*).

1.3.2 Mécanisme de la transduction et persistance du génome

La transduction peut être considérée comme la combinaison des événements aboutissant à l'expression du transgène. Sa réussite passe par le succès de plusieurs étapes, dont la fixation du vecteur à la membrane cellulaire, son entrée dans le cytoplasme, la migration vers le noyau, l'entrée dans le compartiment nucléaire où l'ADN sera libéré pour donner des formes double brin transcriptionnellement actives. Même si les mécanismes mis en jeu sont conservés pour un même vecteur, la réussite de ces événements dépend du type cellulaire. Dans bon nombre d'exemples (mis à part les exemples des thérapies anticancéreuses), la caractéristique d'une cellule transduite doit être l'expression prolongée du transgène.

Tour à tour les étapes de fixation (Summerford and Samulski, 1998) (Summerford et al., 1999) (Qing et al., 1999) (Smith and Helenius, 2004) et de conversion de l'ADN simple brin en double brin (Ferrari et al., 1996) (Fisher et al., 1996) ont été considérées comme des étapes limitantes du transfert de gène. Les phénomènes de migration dans le cytosol et les mécanismes éliminant les particules virales avant leur import dans le compartiment nucléaire sont aujourd'hui considérés avec importance (Yan et al., 2002) (Ding et al., 2003).

a. Voies d'entrée et trafic intracellulaire de l'AAVr

➤ *Adhésion à la cellule*

Nous reporterons ici principalement les voies d'entrée, la cinétique d'infection et les processus de migration jusqu'au compartiment nucléaire essentiellement pour les vecteurs dérivés de l'AAV-2.

Les récepteurs impliqués dans la fixation et l'internalisation des particules sont connus depuis la fin des années 1990. Il avait été déjà décrit que l'AAV-2 sauvage se liait à une glycoprotéine membranaire de 150 kDa (Mizukami et al., 1996). Cette molécule n'a pourtant pas été identifiée.

Summerford et Samulski ont montré par la suite le rôle des protéoglycanes à sulfate d'héparan (HSPG, *heparan sulfate proteoglycans*) dans la fixation de l'AAV-2 recombinant à la membrane des cellules HeLa et CHO (Summerford and Samulski, 1998). L'aptitude d'une cellule à être transduite par l'AAVr de sérotype 2 dépend donc en partie de la présence d'HSPG au niveau de la membrane plasmique.

Des travaux du groupe de Jude Samulski (Rabinowitz et al., 1999) ont montré que le ou les domaines de fixation à l'héparine sont localisés dans VP3. Les auteurs ont généré par mutagenèse insertionnelle (mutation en position 2634) un vecteur dont la capside est composée exclusivement de VP3 (pas de VP1 et VP2 détectables en Western par l'anticorps B1) et qui présente une affinité pour l'héparine. La particule semble avoir une morphologie normale en microscopie électronique.

Le groupe de Muzyczka (Wu et al., 2000) va plus loin en apportant des mutations ponctuelles réparties uniformément sur toute la longueur de la séquence codante des VP. Les mutations consistent soit à remplacer des acides aminés chargés par un résidu Alanine, soit à insérer des épitopes hémagglutinine. Cinq mutants sont défectifs pour la fixation à l'héparine ; les résidus mutés impliqués dans cette perte d'affinité sont répartis dans une boucle de VP3,

au niveau de deux regroupements d'acides aminés acides (régions concernées : acides aminés de 509 à 522 et de 561 à 591).

Récemment, les résidus impliqués dans la fixation à l'héparine ont été identifiés pour l'AAV-2 par les groupes de Muzyczka (Opie et al., 2003) et Kleinschmidt (Kern et al., 2003). Les protéoglycanes à héparan sulfate sont des macromolécules exprimées à la surface de nombreux types cellulaires et entrent dans la composition de la matrice extracellulaire de nombreux tissus (Hileman et al., 1998). La partie glucidique de ces protéines est formée par des répétitions de disaccharides formés de résidus N-acétylglucosamine et acide iduronique liés en α 1,4. Les groupes héparan sulfate interagissent avec un grand nombre de protéines, de manière prédominante par attraction électrostatique des groupements sulfate avec des amas d'acides aminés chargés positivement. Hileman et al (Hileman et al., 1998) ont décrit deux sites consensus de liaison, XBBXBX et XBBBXXBX, et une séquence conformationnelle, TXXBXXTBXXXTB (où B est un acide aminé basique (Histidine, Lysine, Arginine), X est un acide aminé polaire ou non et T est un coude). Bien que les protéoglycanes à sulfate d'héparane sont connus pour participer à l'infection de nombreux virus chez l'homme (Liu and Thorp, 2002) (Smith and Helenius, 2004), les mécanismes moléculaires mis en jeu sont peu connus. Dans les études de Muzyczka (Opie et al., 2003) et Kleinschmidt (Kern et al., 2003), les auteurs introduisent des mutations ponctuelles dans la séquence codant pour les VP. Opie et al montrent que des substitutions des résidus basiques Arginine (chargé positivement) en position 585 et 588 par des résidus neutres Alanine entraînent une perte d'affinité pour l'héparine. Des mutations conservatives à ces deux positions (Arginine remplacée par une Lysine) diminuent légèrement la fixation à l'héparine et l'infectiosité. C'est donc l'attraction électrostatique qui est le médiateur primaire de l'interaction avec le substrat. Des mutations des résidus Arginine en position 484 et 487 et Lysine 532 en résidus Alanine affectent également partiellement la fixation à l'héparine. Les résidus 585 et 588 sont donc majoritairement responsables de la fixation aux groupements héparan sulfate et la mutation de ces résidus a peu d'effet sur le cycle viral (encapsidation notamment). A l'inverse, des mutations des résidus Arginine en position 459, 509, et 526/527 n'affectent pas la fixation à l'héparine mais inhibent tout pouvoir de transduction. La modélisation tridimensionnelle de la capsid du vecteur montre que les résidus impliqués dans la fixation à l'héparine (R585, R588, R475, R487 et K532) forment un amas de cinq acides aminés basiques localisés au niveau des pics entourant les axes de symétrie axiale d'ordre 3 et en regard de celui-ci (voir Figure 11 : « Interaction de la capsid d'AAV-2 avec l'héparine »).

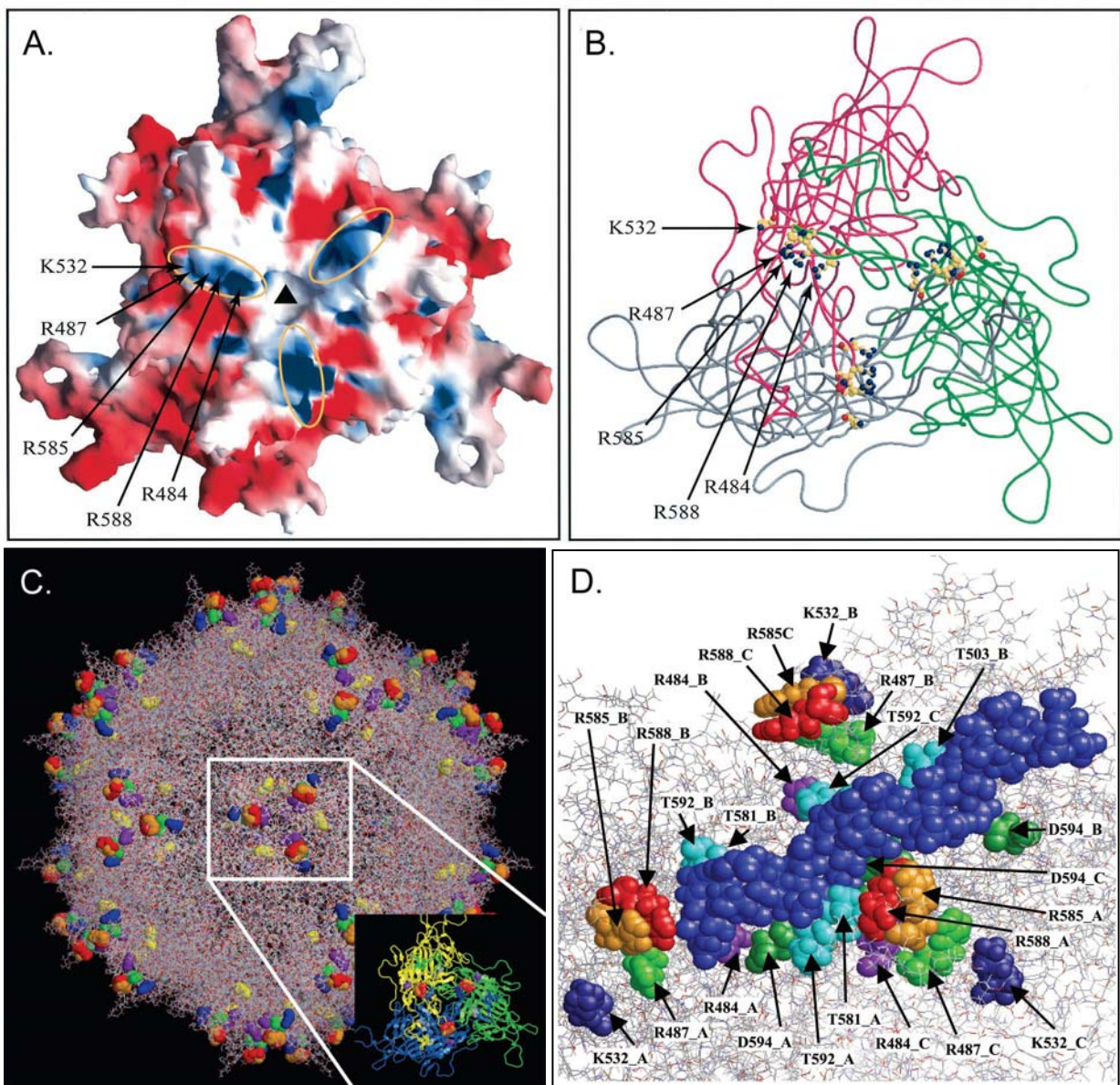


Figure 11 : Interaction de la capside d'AAV-2 avec l'héparine

(A-B) Représentation tridimensionnelle de trimères de VP3 vus selon un axe de symétrie axiale d'ordre 3 (d'après Opie et al., 2003). (A) potentiels électrostatiques de surface d'un trimère de VP3 calculés avec le logiciel GRASP. En bleu sont représentés les potentiels positifs (acides aminés basiques) et en rouge les potentiels négatifs (acides). Les flèches indiquent les positions des acides aminés basiques impliqués dans la fixation à l'héparine. Le triangle noir figure l'axe de symétrie axiale d'ordre 3. (B) modèle de structure tertiaire d'un trimère de VP3 d'AAV-2. Les chaînes carbonées de chaque sous-unité VP3 sont représentées en vert, gris et violet. Les mêmes résidus que précédemment sont indiqués par des flèches et figurés en couleurs conventionnelles : jaune, carbone ; bleu, azote ; rouge, oxygène. (C-D) Localisation et rôle des acides aminés impliqués dans la fixation à l'héparine (d'après Kern et al., 2003). (C) localisation des résidus 585, 588, 484, 487, 532 et 475 sur une capside d'AAV-2 vue selon un axe de symétrie axiale d'ordre 3. orange, R585 ; rouge, R588 ; violet, R484 ; vert, R487 ; bleu, K532 ; jaune, R475. L'insert montre un trimère de VP3 selon le même axe et même modèle que la figure B. (D) Modèle de liaison de l'héparine à la capside d'AAV. Les sphères bleu ciel figurent l'héparine. Les acides aminés qui sont à proximité de la molécule d'héparine et qui peuvent permettre des interactions électrostatiques ou des liaisons hydrogènes sont indiqués par des flèches. Les lettres A, B et C indiquent les trois sous-unités de VP3 constituant le trimère observé.

La fixation à l'héparine est dépendante du bon assemblage en trimère des sous-unités VP3 (Kern et al., 2003). Kern et al identifient quant à eux, avec la même démarche, un résidu supplémentaire impliqué dans la fixation à l'héparine (mutation du résidu Arginine 475 en Alanine). Ce résidu ne joue pas un rôle par une interaction directe avec la capside, mais se trouve à l'intérieure de la capside, à la limite entre les sous-unités de VP3 et peut donc influencer indirectement la fixation à l'héparine en perturbant l'assemblage correct des sous-unités. Les auteurs vont plus loin que les précédents en proposant un modèle de fixation de l'héparine sur la capside de l'AAV-2 (Figure 11.D).

D'une manière étonnante, les résidus Arginine 585 et 588 ne sont pas conservés chez l'AAV-3 où ils sont remplacés respectivement par des résidus neutres Sérine et Thréonine. L'AAV-2 et l'AAV-3 se lient pourtant à l'héparan sulfate (Negishi et al., 2004) (Rabinowitz et al., 2004). Toutefois, sur une colonne d'héparine, leurs profils d'élution ne sont pas semblables, ce qui signifierait qu'ils interagissent différemment avec ce substrat (Rabinowitz et al., 2002). A l'inverse, l'AAV-4 et l'AAV-5 n'interagissent pas avec les groupements héparan sulfate (Negishi et al., 2004), mais avec des acides sialiques. L'AAV-5 interagit avec les acides sialiques liés en α 2-3 (Walters et al., 2001) et α 2-6 (Kaludov et al., 2001), alors que l'AAV-4 interagit avec des acides sialiques liés en α 2-3 uniquement (Kaludov et al., 2001). L'AAV-5 interagit avec les acides sialiques présents sur les oligosaccharides N-liés, et l'AAV-4 avec les acides sialiques des oligosaccharides O-liés (Kaludov et al., 2001) et la mucine (Rabinowitz et al., 2004). Le récepteur au facteur de croissance des thrombocytes (peptide PDGFR- α) a été identifié récemment comme un des récepteurs de l'AAV-5 (Di Pasquale et al., 2003). De plus, l'AAV-1 n'utilise apparemment pas les héparan sulfate (Rabinowitz et al., 2004) (Negishi et al., 2004), et ces récepteurs et son mode de fixation à la cellule restent inconnus. Les récepteurs des sérotypes 7 et 8 ne sont pas identifiés. Toutefois ces virus sont proches de l'AAV-1, il est probable qu'ils aient un récepteur commun (Gao et al., 2002).

Les motifs impliqués dans le tropisme tissulaire de l'AAV-1 ont été étudiés par Hauck et al (Hauck and Xiao, 2003). Bien que la protéine VP1 d'AAV-1 présente 80% de nucléotides en commun avec celle de l'AAV-2 (et 83% d'acides aminés similaires) (Xiao et al., 1999), les tropismes de deux vecteurs, notamment le taux de transduction musculaire, sont très différents. Les acides aminés différents ne sont pas distribués uniformément le long de VP1,

mais regroupés en plusieurs points. Les auteurs ont montré que les acides aminés majeurs jouant un rôle dans le tropisme du vecteur sont les résidus 213 à 423.

Plus précisément, la partie C-terminale de VP1 est prédominante dans l'efficacité de transduction du muscle. Hauck et al (Hauck and Xiao, 2003) étudient les domaines impliqués dans l'efficacité de la transduction en remplaçant des parties de VP1 dans un vecteur AAV-2 par des domaines de VP1 de sérotype 1, et inversement. Les auteurs comparent l'expression de facteur IX à 6 semaines après injection intramusculaire des vecteurs chez des souris CD4-*knockout*. Les vecteurs AAV-2 dont la partie C-terminale est remplacée par celle d'AAV-1 (domaine 352 à 736) transduisent le muscle de manière comparable au sérotype 1. Les vecteurs AAV-1 dont la même partie C-terminale de VP1 est remplacée par celle de l'AAV-2 ne transduisent plus le muscle. Plus précisément, les séquences 213 à 423 et 670 à 736 sont déterminantes. En se basant sur le fait que le remplacement de la séquence 350 à 423 diminue le taux de transduction de 60%, les auteurs concluent au rôle déterminant de cette séquence. Il faut toutefois souligner l'importance de la séquence 213-423 qui n'apparaît pas dans leur conclusion. La suppression du domaine 213-350 entraîne en effet une perte de 75% du pouvoir de transduction.

Il faut souligner que ces travaux ne permettent pas d'identifier les domaines impliqués dans la fixation à la cellule et donc l'interaction avec le ou les récepteurs non identifiés de l'AAV-1. Les domaines étudiés peuvent jouer un rôle dans d'autres événements de la transduction. Notamment, le ratio particules pleines / particules infectieuses n'est pas déterminé entre les recombinants. Enfin, il n'est pas clair que les VP recombinantes aient la même structure que les VP sauvages et que les épitopes soient présentés de la même façon.

➤ *Endocytose et trafic intracellulaire*

Même si des études montrent qu'*in vivo* les fibres musculaires lentes sont transduites plus efficacement que les fibres rapides exprimant des niveaux d'HSPG moindres (Pruchnic et al., 2000) (Manno et al., 2003), l'entrée dans la cellule fait intervenir d'autres mécanismes que l'interaction avec les groupements héparan sulfate. Il faut aussi souligner qu'il s'agit de

groupements exprimés à la surface de nombreux types cellulaires et qu'il sont impliqués dans la fixation non spécifique de nombreux virus (Smith and Helenius, 2004) : virus Herpes, virus de la dengue, virus de l'encéphalite de la taïga (*tick-borne encephalitis virus*), Papillomavirus, Paramyxovirus de type 3, et virus Sindbis.

Le récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGF-R1) ainsi que la chaîne $\beta 5$ de l'intégrine $\alpha V\beta 5$ ont été identifiés comme des co-récepteurs de l'AAV-2 impliqués dans l'endocytose de la particule (Qing et al., 1999) (Summerford et al., 1999). L'étude de Summerford et al (Summerford et al., 1999) montre que la présence d'intégrines à la surface des cellules augmente l'efficacité de transduction. Elle favorise davantage l'entrée des particules d'AAV-2 que la fixation à la membrane cellulaire, suggérant que ce « co-récepteur » pourrait être impliqué dans le processus d'internalisation ou de trafic intracellulaire plutôt que dans la phase d'attachement proprement dite. Le groupe d'Engelhardt (Sanlioglu et al., 2000) a confirmé ces résultats en montrant que des anticorps dirigés contre la chaîne $\beta 5$ n'empêchaient pas la liaison de l'AAV-2 à la surface de cellules HeLa mais inhibaient son internalisation.

Le suivi des particules (détection en immunofluorescence ou quantification de l'ADN internalisé après lavage des cellules) montre que la phase d'entrée dans la cellule est courte. La visualisation de la cinétique d'infection des cellules vivantes en temps réel a été faite récemment (Seisenberger et al., 2001).

Dans les cellules HeLa, plus de 75% des particules se retrouvent dans le cytoplasme 30 minutes après infection (Bartlett et al., 2000) (Sanlioglu et al., 2000). L'entrée dans la cellule est dépendante de la dynamine et s'opère par endocytose dans des puits recouverts de clathrine (Bartlett et al., 2000). Sanlioglu et al (Sanlioglu et al., 2000) et Bartlett et al (Bartlett et al., 2000) proposent un modèle d'endocytose des particules d'AAV-2 faisant intervenir l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (voir Figure 12 page suivante : « Entrée et trafic intracellulaire de l'AAV »). La pénétration est dépendante de l'énergie et ne s'opère pas à 4°C. Elle nécessite l'activation GTP-dépendante de la protéine Rac-1 (Sanlioglu et al., 2000) qui induirait en cascade l'activation de la kinase PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase).

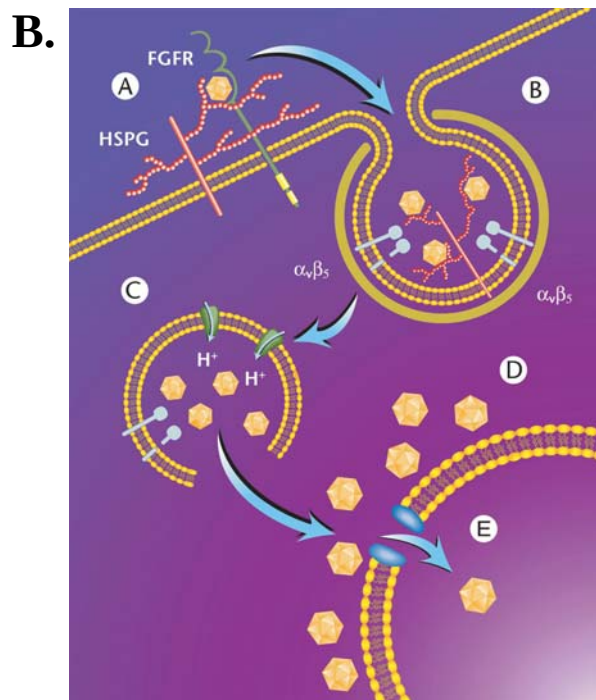
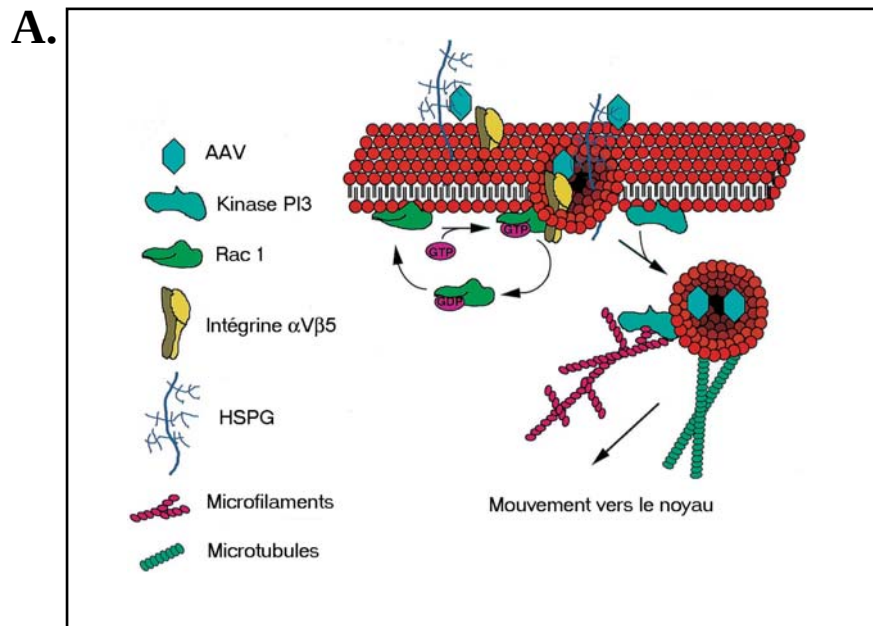


Fig 12 : Entrée et trafic intracellulaire de l'AAV

A. Modèle d'endocytose des particules d'AAV-2 (d'après Sanlioglu et al., 2000). L'endocytose de l'AAV-2 dans les cellules HeLa est facilitée par la fixation au récepteur HSPG et à l'interaction avec l'intégrine $\alpha V \beta 5$. La liaison de Rac1 au GTP et son activation, potentiellement par l'intégrine $\alpha V \beta 5$, est nécessaire à l'endocytose de la particule. Après l'endocytose, Rac 1 stimulerait les voies d'activation de la protéine kinase PI3, qui facilite les réarrangements du cytosquelette (microfilaments et microtubules) impliqués dans le migration jusqu'au noyau.

B. Modèle de trafic intracellulaire de l'AAV-2 (d'après Bartlett et al., 2000). Après fixation au récepteur membranaire HSPG des cellules HeLa (étape A), l'AAV est internalisé rapidement via des puits recouverts de clathrine (étape B), et interaction avec l'intégrine $\alpha V \beta 5$. Le virus internalisé dans les endosomes précoces subit une légère acidification du milieu et est relargué dans le cytoplasme à partir des endosomes tardifs (étape C). Les particules s'accumulent en région périnucléaire (étape D) et pénètrent dans le compartiment nucléaire (étape E).

Le cheminement jusqu'au noyau se fait dans le compartiment endosomal. Une seule particule est présente par endosome (Seisenberger et al., 2001). L'utilisation de nocodazole (dépolymérise les microtubules) et de cytochalasine B (désorganise les microfilaments) a mis en évidence l'intervention du cytosquelette (Sanlioglu et al., 2000). L'acidification des endosomes est une étape indispensable de la transduction ; le traitement des cellules par le chlorure d'ammonium ou la bafilomycine A1 inhibe fortement la transduction dans les cellules HeLa (Bartlett et al., 2000) (Douar et al., 2001) et dans une moindre mesure les cellules HepG2 et 293 (Douar et al., 2001) (Hansen et al., 2001a). Selon le modèle de Hansen et al, les particules cheminent dans les cellules 293 dans les endosomes précoces neutres (faible densité) puis les endosomes tardifs acides (densité forte) jusqu'aux lysosomes (Hansen et al., 2001a). La migration dans le compartiment endosomal est rapide, l'inhibition de l'acidification du compartiment endosomal n'a en effet aucun impact sur le taux de transduction une heure après l'infection (Hansen et al., 2001a) (Bartlett et al., 2000). Les particules seraient relarguées dans l'espace périnucléaire au bout de deux heures. Il faut noter que les mécanismes et la cinétique de migration de l'AAV-3 seraient identique à l'AAV-2 (Bartlett et al., 2000).

Le fait que les particules ne migrent pas par le compartiment endosomal tardif acide pourrait être responsable du défaut de transduction de certains types cellulaires. Les cellules NIH-3T3, dérivées de fibroblastes de souris, ne sont pas transduites par l'AAV-2. Les particules pénètrent toutefois dans le cytoplasme. A l'inverse des cellules 293 où la quasi-totalité de l'ADN est détectée dans le noyau 48 heures post infection, l'ADN transféré dans les 3T3 se retrouve majoritairement dans le cytoplasme. Le traitement de ces cellules par de l'hydroxyurée restaure le trafic dans les endosomes tardifs acides et permet d'augmenter le taux de transduction (Hansen et al., 2001a). On pensait également que l'hydroxurée favorisait la synthèse de l'ADN double brin à partir du simple brin ; cet effet serait marginal.

Notons aussi que de façon étonnante Xiao et al ne détectent pas de particules dans les endosomes tardifs des cellules HeLa, alors qu'elles sont transduites (Xiao et al., 2002). Il faut noter que si les voies empruntées varient d'un type cellulaire à un autre, elles sont aussi fonction de la voie d'infection. L'infection de cellules épithéliales pulmonaires en culture par le pôle baso-latéral est beaucoup plus efficace que par le pôle apical (Duan et al., 2000). Même si l'endocytose varie selon le pôle infecté, le défaut de transport des particules d'AAV-2 jusqu'au noyau représente l'obstacle majeur de la transduction par le pôle apical.

Une grande partie des particules est dégradée soit dans les lysosomes, soit par le complexe du protéasome. L'ajout d'inhibiteurs du protéasome (LLnL, Z-LLL ou MG-132) au moment de l'infection augmente le taux d'expression du transgène (Yan et al., 2002) (Duan et al., 2000) jusqu'à 50 fois (Douar JVirol 2001), après infection d'AAV-2 ou d'AAV-5 (Yan et al., 2002). Le traitement s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'ADN simple brin accumulé 24 heures post infection (Douar et al., 2001). De manière identique, dans l'étude de Duan et al, l'inhibition de l'ubiquitine ligase E3 augmente considérablement l'expression du transgène après infection des cellules épithéliales pulmonaires par voie apicale (Duan et al., 2000) (voir également la partie « Transfert de gène dans le poumon »). Les particules sont dégradées après ubiquitinylation (Yan et al., 2002) ; les inhibiteurs de l'ubiquitine ligase augmentent la transduction (Duan et al., 2000). Les particules modifiées avant infection (dans l'étude de Yan et al, chauffage des particules à 95°C pendant 10 minutes) seraient ubiquitinylées de manière préférentielle. De même, on pense que les particules relarguées de manière précoce dans le cytosol pourraient être ubiquitinylées et dégradées par le protéasome avant d'atteindre le noyau (Yan et al., 2002) (Duan et al., 2000) (Douar et al., 2001).

➤ *Import nucléaire et décapsidation*

Sanlioglu et al ont montré en microscopie confocale sur des cellules HeLa que les particules atteignaient le noyau 3 heures post infection (Sanlioglu et al., 2000). Une étude en temps réel avec une sensibilité plus élevée montre qu'il est possible de détecter au moins une particule dans 50% des noyaux 15 minutes après infection (Seisenberger et al., 2001).

Les mécanismes d'import dans le compartiment nucléaire et de modalités de la décapsidation sont mal connus. Hansen et al ont infecté des noyaux purifiés de cellules permissives (293) ou non (NIH-3T3) à l'AAV-2 et suivi la cinétique de pénétration des particules par immunofluorescence. Les particules pénètrent dans le noyau des deux types cellulaires en 15 minutes selon un mécanisme passif (import également à 4°C) (Hansen et al., 2001b). Ces résultats montrent que l'entrée dans le noyau ne serait pas une étape limitante de la transduction pour ces deux exemples et conforte ainsi que l'efficacité du routage vers le noyau est l'étape limitante majeure. Même si la taille des pores nucléaires (39 nm) permettrait le passage des particules virales (20 à 25 nm), la pénétration dans le compartiment nucléaire ne ferait pas intervenir le complexe des pores nucléaires (Hansen et al., 2001b) (Xiao et al., 2002). L'utilisation d'anticorps anti-p62 ou d'agglutinine de germe de blé, bloquant les complexes, n'inhibe pas l'import des particules (Sanlioglu et al., 2000). Les mécanismes impliqués dans le passage de la membrane nucléaire ne sont pas connus.

Enfin, la détection de particules intactes dans le noyau suggère que la décapsidation s'opère à cet endroit. De plus, l'incubation de particules avec un extrait nucléaire entraîne la lyse de la capsid, alors que ce n'est pas le cas avec des extraits cytoplasmiques (Thomas et al., 2004). Les modalités de décapsidation ne sont pas connues à l'heure actuelle.

Toutefois, la cinétique de décapsidation jouerait un rôle dans l'efficacité de transduction entre les sérotypes. Ainsi il a été montré que l'AAV-8 permettait de multiplier le niveau d'expression du transgène d'un facteur 10 à 100 comparé à l'AAV-2 (Gao et al., 2002) (Thomas et al., 2004). Pourtant, le groupe de Mark Kay montre qu'après injection intraportale chez la souris, le nombre de copies détectables par hépatocyte est 2 à 3 fois supérieur après transfert de gène médié par l'AAV-2, comparé à l'AAV-8 (Thomas et al., 2004). Les formes détectables d'AAV-2 restent en fait sous forme encapsidée pendant au moins 3 semaines (même 37% de formes encapsidées à 42 jours) et des capsides intactes sont mises en évidence avec l'anticorps A20. La décapsidation de l'AAV-8 est apparemment beaucoup plus rapide (10,6 % de formes encapsidées à un jour, 1,5 % à 21 jours). La formation d'ADN transcriptionnellement actif serait plus rapide, corrélée avec la cinétique et le taux d'expression du transgène.

b. Conversion du génome simple brin en double brin

La conversion du génome simple brin en double brin a été considérée très tôt comme une étape limitante de la transduction médiée par l'AAV *in vitro*. Le fait que la co-infection par un adénovirus accélère et augmente l'expression du transgène a conforté cette idée. On sait en effet que la cinétique d'expression du transgène est longue après transfert médié par l'AAV-2 (délai de plusieurs semaines entre l'injection du vecteur *in vivo* et le plateau d'expression) (voir partie « Transfert de gène *in vivo* »). Les travaux de Fisher et al (Fisher et al., 1996) et Ferrari et al (Ferrari et al., 1996) ont montré que l'augmentation de la détection de la forme double brin est corrélée avec la détection du produit du transgène jusqu'à un facteur 1000 dans des cellules co-infectées par un AAVr et un adénovirus en comparaison à des cellules infectées par un AAVr seul. De plus, l'injection simultanée d'adénovirus avec l'AAVr dans le foie et le poumon de souris augmente de façon significative la transduction *in vivo* trois jours après l'injection du vecteur (Fisher et al., 1996). D'autres facteurs ont les mêmes effets que l'adénovirus, notamment des facteurs de stress cellulaires tels que des chocs thermiques, des agents génotoxiques (hydroxyurée, rayons ultraviolets, rayons X) (Ferrari et al., 1996), des inhibiteurs de la synthèse d'ADN et des topoisomérases (Russell et al., 1995).

La co-infection par l'adénovirus sauvage ou les facteurs helper cités plus haut favoriseraient la synthèse du brin complémentaire par la machinerie cellulaire (Fisher et al., 1996) (Ferrari et al., 1996). Il faut toutefois noter qu'en comparaison aux modes de production actuels (Salveti et al., 1998) (Wang et al., 1998) (Grimm et al., 1998), la contamination potentielle en particules « rep-positives » pourrait favoriser ce mécanisme. L'effet auxiliaire de l'adénovirus pourrait aussi jouer au niveau post-traductionnel ; la protéine codée par ORF6-E4 forme un complexe avec E1B(55kDa) qui favorise le transport cytoplasmique des ARNm (Fisher et al., 1996). L'adénovirus faciliterait également la translocation nucléaire des particules dans un mécanisme indépendant des pores nucléaires (Xiao J Virol 2002).

Des expériences récentes confirment aussi que la formation d'ADN double brin est une étape limitante de la transduction. L'utilisation de vecteurs véhiculant de l'ADN double brin permet d'augmenter l'expression du transgène *in vitro* (McCarty et al., 2001) (Ding et al., 2003) et *in vivo* (chez la souris dans le foie (Thomas et al., 2004) et dans une moindre mesure

le cerveau (McCarty et al., 2001) et le poumon (Ding et al., 2003)). De plus, le nombre de copies du transgène après transfert de formes d'ADN double brin est nettement supérieur qu'après transfert de formes simple brin (Thomas et al., 2004). Ceci suggère qu'une grande partie de l'ADN transféré sous forme simple brin est dégradée.

Des études majoritairement faites *in vitro* ont montré qu'une protéine cellulaire appelée ssD-BP (*single stranded D binding protein*) était impliquée dans la conversion de l'ADN simple brin en double brin (Wang et al., 1996) (Wang et al., 1997) (Qing et al., 1997) (Qing et al., 2001). Cette protéine peut se fixer sur la séquence D(-) de l'ITR de l'AAV-2. La séquence D(-) est une séquence simple brin de 20 nucléotides placée en 5' de l'ITR 3'. Elle est complémentaire d'une séquence D(+) située à l'extrémité 5' du génome. Elle est nécessaire à la réplication de l'AAV sauvage (Wang et al., 1996) (Wang et al., 1997). L'affinité pour la séquence D est fonction de son état de phosphorylation au niveau de résidus Tyrosine : elle se fixe à l'état phosphorylé (Qing et al., 1997). Elle perd son affinité en présence d'adénovirus ou de E4-ORF6 et permet la réplication du génome de l'AAV sauvage (Qing et al., 1997). Les inhibiteurs des tyrosine kinases (génistéine) permettent d'augmenter considérablement le taux de transduction de cellules HeLa (Qing et al., 1997) (Qing et al., 1998). Le niveau de déphosphorylation de la ssD-BP aurait également un impact sur le taux de transduction de différents types cellulaires (Qing et al., 1998). Le récepteur au facteur de croissance de l'épiderme serait impliqué dans la phosphorylation de la protéine. Une partie de la séquence d'acides aminés de la ssD-BP est identique à la protéine FKBP52, protéine de liaison au FK506 (immunosuppresseur utilisé notamment en greffe d'organes) (Qing et al., 2001). Des tests de réplication *in vitro* en présence d'enzyme *Klenow* montrent que la déphosphorylation de FKBP52 permet la synthèse d'ADN à partir de l'ITR 3' (Qing et al., 2001). De plus, le niveau d'expression de FKBP52 dans les lignées cellulaires permissives (293, HeLa), ou non (NIH-3T3) est corrélé au niveau de transduction. Qing et al proposent un modèle dans lequel la protéine FKBP52 serait fixée sur la séquence D à l'état phosphorylé, et perdrait son affinité en étant déphosphorylée en présence d'adénovirus ou de E4-Orf6. Elle permettrait alors la synthèse d'ADN double brin et l'expression du transgène.

Toutefois, l'hypothèse d'une synthèse d'ADN double brin à partir des simples brins transférés n'est pas confirmée par les études *in vivo*. En effet, beaucoup d'études *in vivo* font penser que le double brin serait formé par réappariement passif des brins simples de polarités + et -.

Il apparaît qu'après injection intramusculaire d'AAVr chez la souris, des formes d'ADN double brin sont obtenues dans les premiers jours après l'administration du vecteur (Vincent-Lacaze et al., 1999). L'étude précise de la cinétique de conversion du génome viral montre que de l'ADN double brin est même détectable 24 heures après injection et que sa quantité est croissante jusqu'à 7 jours. La détection précoce des formes double brin serait plus explicable par un appariement passif des monobrin d'ADN d'orientation + et – que par un mécanisme de réplication impliqué dans la génération du double brin de l'AAV sauvage. Or, la cinétique d'expression du transgène n'est pas corrélée avec le nombre de copies double brin du transgène. En effet, le nombre de copies de génome AAVr détectables par Southern blot décroît après l'injection (Vincent-Lacaze et al., 1999) (Schnepp et al., 2003), alors que l'expression du transgène atteint un plateau seulement deux semaines post-injection. Ainsi, la synthèse du double brin ne serait apparemment pas le principal facteur limitant dans l'expression du transgène.

Une étude antérieure réalisée à partir de foie de souris après injection d'AAVr par voie intra-portale montrait une conversion de l'ADN simple brin en double brin sur 5 semaines (Miao et al., 1998). Plus tard, le groupe de Mark Kay a étudié la structure du génome de l'AAVr dans le foie de souris à long terme (Nakai et al., 2000). Les auteurs ont utilisé des vecteurs dont le génome est méthylé, par production dans des cellules 293 exprimant la méthylase *Dam* d'*E. Coli*. Considérant que la synthèse d'ADN dans les cellules eucaryotes produit des formes méthylées, ils ont soumis l'ADN extrait à des enzymes de restriction capables de couper soit les formes méthylées (*DpnI*), soit non méthylées (*MboI*). Ils ont ainsi montré que les formes génomiques détectées à long terme n'étaient pas sensibles à la digestion par *MboI*, ce qui signifie que les formes génomiques détectées ne proviennent pas de la réplication du génome viral. Sur la base de ces résultats, on peut donc penser que la conversion du simple brin en double brin ne ferait pas intervenir des phénomènes de réplication cellulaire, mais l'appariement des deux brins + et – issus des vecteurs. De plus, l'utilisation de vecteurs marqués avec plusieurs sites de restriction a conforté cette hypothèse. Les auteurs ont utilisé deux vecteurs dont la séquence ne diffère que par un site de restriction (*BamHI* ou *EcoRI*), occupant des positions proches dans le vecteur. Dans l'hypothèse où la formation du second brin s'effectue par synthèse d'ADN, les sites de restriction doivent être conservés. Si par contre la génération du double brin se fait par appariement passif des formes + et –, les sites de restriction ne sont plus systématiquement conservés. Après digestion par ces deux enzymes et amplification de la région des sites de coupure par PCR cachée, les

auteurs ont montré la présence de monomères monobrin résistants aux enzymes de restriction utilisées. Ces résultats seraient en faveur d'un appariement aléatoire des brins d'orientation contraire provenant des deux vecteurs. Les concatémères obtenus par la suite seraient issus de la recombinaison entre les formes double brin. Les auteurs proposent enfin un modèle de transduction médiée par l'AAV (voir Figure 13 page suivante : « Modèle de la formation du second brin de l'AAVr par appariement des génomes simple brin de polarité opposée »)

c. Formes de persistance du génome double brin

Trois hypothèses peuvent expliquer la persistance de l'AAVr : intégration par recombinaison non homologue, persistance sous forme extrachromosomique (épisomes) ou combinaison de formes intégrées et épisomiques.

La persistance du génome de l'AAVr a été très souvent associée à la détection de concatémères *in vivo*, après injection dans le muscle ou le foie (Fisher et al., 1997) (Clark et al., 1997) (Xiao et al., 1996) (Snyder et al., 1997a) (Miao et al., 1998) (Duan et al., 1998) (Herzog et al., 1999). Ces concatémères sont décrits la plupart du temps comme des formes multimériques d'orientation tête-queue (succession de génomes d'AAVr de même orientation). Les formes de persistance de l'ADN seraient majoritairement épisomiques.

Duan et al (Duan et al., 1998) et Yang et al (Yang et al., 1999) montrent que l'augmentation de l'expression du transgène après administration dans le muscle squelettique s'accompagne de la génération de formes épisomiques circulaires. Les fractions isolées passeraient d'un faible poids moléculaire (formes monomériques prédominantes) trois semaines après l'injection à un haut poids moléculaire (formes multimériques prédominantes) 11 semaines post-injection, ce qui serait en faveur de la recombinaison des formes circulaires au cours du temps.

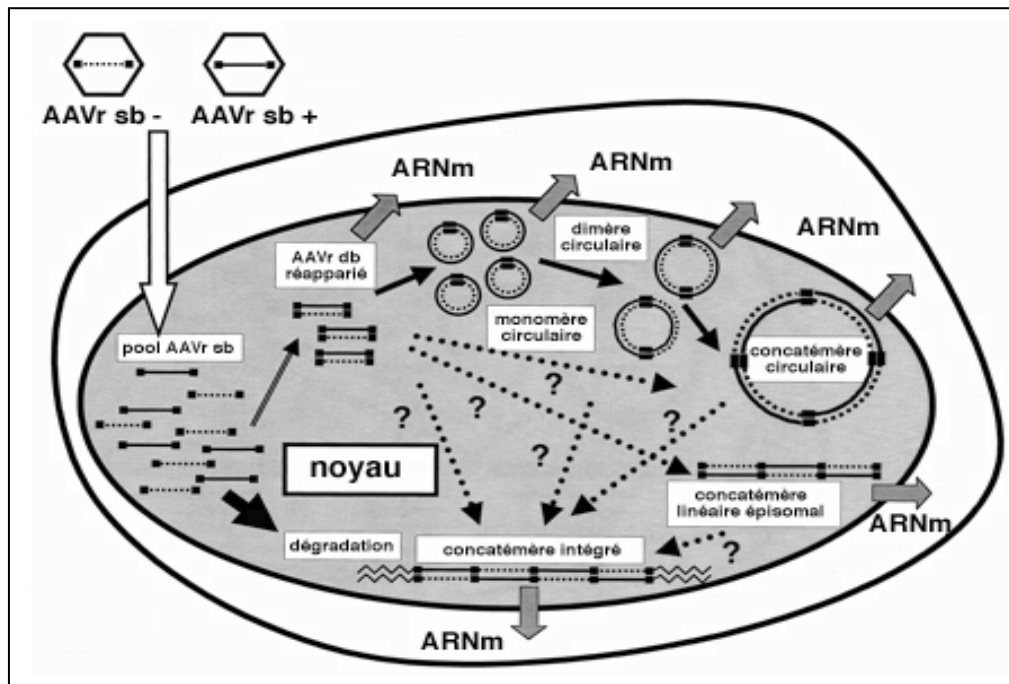


Figure 13 : Modèle de la formation du second brin de l'AAVr par appariement des génomes simple brin de polarité opposée (d'après Nakai et al., 2000)

Le modèle établi après injection d'AAVr dans le foie de souris soutient l'hypothèse de la formation du génome double brin linéaire (monomère) par appariement dans le noyau des formes simple brin positives et négatives du vecteur. La plupart des génomes simple brin non réappariés seraient dégradées sur une période de 1 à 2 mois. Les formes double brin seraient converties en formes circulaires (monomères doubles brins) plus stables. Des dimères circulaires ou des concatémères circulaires épisomiques de grande taille se formeraient par recombinaison. Il n'est pas exclu que des concatémères linéaires se forment et persistent. Même si les mécanismes de la conversion de l'ADN simple brin en double brin sont mal connus, ce modèle soutient l'hypothèse que les formes de persistance de l'ADN transféré sont majoritairement des concatémères extrachromosomiques.

Parmi les dernières études, seule celle de Nathalie Vincent-Lacaze (Vincent-Lacaze et al., 1999) propose que les concatémères obtenus à long terme proviennent de la réplication d'une forme intermédiaire double brin circulaire selon un mécanisme de réplication par cercle roulant.

Pourtant, bon nombre d'études sont en faveur d'un processus de recombinaison dirigeant la formation des concatémères. Ainsi, Yang et al (Yang et al., 1999) montrent que la co-injection de deux AAVr véhiculant deux transgènes différents génère des formes multimères constituées des deux génomes. En utilisant deux vecteurs différents, dont l'un comporte une séquence ori, ils montrent par rescue bactérienne que la concatémérisation des génomes circulaires s'effectuerait non pas par réplication mais par recombinaison. Ils montrent en outre que, non seulement la circularisation de l'ADN double brin est croissante dans les 4 mois qui suivent l'injection, mais que les processus de recombinaison le sont aussi sur cette période.

En accord avec des études ultérieures concernant le foie (Nakai et al., 2000) (Song et al., 2001a) et le muscle de souris (Song et al., 2001b), cette étude montre que les concatémères isolés n'ont pas d'orientation prédominante (tête-queue, tête-tête, queue-queue).

Dans une étude en 1998, Miao et al (Miao et al., 1998) montrent que 13 semaines après administration d'AAVr dans le foie de souris, aucun signal n'est détecté après migration en champ pulsé dans des fragments de moins de 1 Mb. Ceci irait dans le sens de l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire. De plus, ils montrent en hybridation in situ par fluorescence (FISH) que l'ADN viral serait sous forme intégrée dans environ 5% des hépatocytes. Ces résultats sont conformes à ceux de Snyder et al (Snyder et al., 1997a).

Plus tard, deux études majeures ont confirmé l'existence de formes intégrées. L'une, prenant toujours le foie comme organe cible (Nakai et al., 1999) était basée sur la circularisation des séquences supposées intégrées après digestion enzymatique et religation. L'ADN ainsi obtenu était ensuite analysé après clonage bactérien. Le séquençage des plasmides isolés a révélé l'existence de jonctions entre le génome viral et le génome cellulaire. Il apparaît que les séquences intégrées le sont de façon aléatoire au sein du génome murin et que l'intégration s'accompagne de délétions partielles ou totales des ITR. Un an auparavant, Wu et al (Wu et al., 1998) avaient mis en œuvre une technique plus simple permettant d'identifier les jonctions entre les génomes viral et cellulaire. La technique de PCR spécifique (PCR cachée) utilisait une amorce complémentaire des séquences Alu (ou B1 chez

la souris) répétées et conservées au sein du génome. Cette technique a été utilisée après infection de neurones humains en culture et sur des cerveaux de rat deux semaines après injection. Le séquençage des fragments de PCR a aussi montré que l'AAVr s'intégrait de manière aléatoire dans les neurones en culture, à la faveur de remaniements des ITR.

Toutefois, ces études n'ont pas permis de quantifier le rendement d'intégration du vecteur.

En effet, le groupe de Mark Kay (Nakai et al., 2000) (Nakai et al., 2001) publie par deux fois des résultats en faveur d'un très faible taux d'intégration. Une hépatectomie aux deux tiers pratiquée 12 semaines après l'injection d'AAV-facteur IX (fIX) s'accompagne d'une réduction de l'expression du transgène et d'une diminution du nombre de copies d'un facteur 5 à 10 après régénération hépatique. Dans leur publication de 2000 (Nakai et al., 2000), les auteurs montrent que le génome viral, injecté sous forme méthylé, reste très majoritairement sous cette forme. Ils concluent d'ailleurs l'année suivante (Nakai et al., 2001) que les formes intégrées dans le génome représenteraient 10% des formes responsables de l'expression à long terme du transgène. Le reste serait constitué de concatémères extra-chromosomiques d'orientations diverses.

Il n'y a à l'heure actuelle aucune évidence d'intégration de l'AAVr après transfert dans le muscle (Snyder et al., 1997b) (Vincent-Lacaze et al., 1999) (Herzog Nat Med 1999) (Song PNAS 2001). Plus récemment, Schnepf et al (Schnepf et al., 2003) n'ont pas pu conclure à une intégration de l'AAV, 6 à 57 semaines après injection intramusculaire chez la souris. Ils ont utilisé trois approches : i) essai d'isolation de jonctions hôte-vecteur par criblage d'une banque de phage λ obtenue à partir d'ADN de muscle ayant un nombre élevé de copies de vecteur, ii) amplification de séquences virales par PCR quantitative après PCR B1 (PCR Alu-like chez la souris) et iii) identification des formes de persistance de l'AAV par utilisation d'une DNase spécifique de l'ADN circulaire double brin (donc digérant les formes épisomiques).

Parmi ces techniques, celle utilisant la PCR B1 suivie de PCR quantitative devait être la plus sensible. Les séquences B1 sont l'équivalent chez la souris des séquences Alu humaines. D'une longueur de 135 paires de bases, elles représentent 1% du génome (80000 à 100000 copies par génome haploïde, soit une séquence en moyenne toutes les 15 kb). Les auteurs ont réalisé une PCR avec des amorces spécifiques des séquences B1. Le nombre de copies de

transgène avant et après cette PCR a été déterminé par PCR quantitative avec des amorces spécifiques du promoteur ou du transgène utilisé. Les formes épisomiques ne sont pas amplifiées par la première PCR, la sensibilité de la méthode dépend donc du ratio initial entre les formes intégrées et les formes épisomiques. Les auteurs consacrent une grande partie de la publication à la mise au point en utilisant des clones stables de cellules musculaires de souris (C2C12) présentant en moyenne 4,5 copies de CMV-GFP par génome. Ils mélangent à l'ADN génomique après extraction des quantités croissantes de plasmide CMV-LacZ. En comparant le bruit de fond obtenu avec une gamme de plasmide LacZ seul, ils concluent qu'il est possible de détecter 75 séquences intégrées parmi 15000 épisomes. Il est donc possible de mettre en évidence une intégration à partir d'un rendement d'intégration de 0,5%. Ils appliquent cette technique sur l'ADN génomique de souris (récupération des muscles 6 à 57 semaines post injection d'AAV CMV-OVA). Pour la PCR quantitative, les échantillons de plus de 15000 copies par réaction ont été dilués. L'amplification des séquences vectorielles est inférieure au bruit de fond défini lors de la mise au point, il y a donc moins de 0,5% de copies intégrées. Ils montrent ensuite que le transgène persiste de façon prédominante sous forme d'épisomes de tailles variables. Ils utilisent pour cela une DNase particulière, la PS-DNase, qui ne coupe que l'ADN circulaire double brin. L'ADN génomique des muscles a été analysé en Southern après digestion par une enzyme dont le site de coupure ne se trouve pas dans le vecteur. Après action de la PS-DNase, les seules formes d'ADN restantes sont les formes épisomiques. Des formes monomériques et multimériques (concatémères de plus de 12 kb) circulaires sont mises en évidence en Southern.

Toutefois, sans remettre en cause les conclusions de cet article, quelques points peuvent être discutés. Tout d'abord, les auteurs considèrent que les clones stables de cellules C2C12 ont intégré le génome des vecteurs AAV-CMV-GFP. Même après 10 passages, rien ne permet d'affirmer que l'ADN ne persiste pas sous forme épisomique, d'autant plus que l'étude conclue que l'intégration de l'AAV dans des cellules musculaires est très faible. Les justificatifs fournis ne sont pas suffisants pour prouver l'intégration du vecteur dans ces cellules. D'autre part, la mise au point de la PCR quantitative s'est faite avec des transgènes différents, et surtout des primers différents, que ceux utilisés *in vivo*. On peut craindre que l'efficacité de la PCR quantitative ne soit pas comparable. Enfin, et même si cela ne change pas le message de l'article, la PS-DNase peut apparemment couper de l'ADN circulaire sous forme relâché.

1.3.3 Transfert de gène in vivo

Les premiers essais de transfert de gène chez l'animal datent du début des années 1990. Ils concernaient pour la plupart le poumon, dans le but de pouvoir faire exprimer à terme un gène thérapeutique chez des patients atteints de mucoviscidose. Ainsi, le groupe de T. Flotte faisait exprimer l'ADNc du CFTR sous le contrôle de la séquence D de l'ITR ou du promoteur p5 (Flotte et al., 1993a) (Flotte J.BioenerBiomemb 1993) (Flotte JBC 1993) (Flotte GeneTher 1995).

Outre le fait que l'on ait pu, chez le rongeur, sélectionner le meilleur sérotype en fonction de l'organe cible, l'utilisation de différents sérotypes chez un même animal, et à fortiori chez un même patient pourrait s'avérer judicieuse. Nous l'avons déjà précisé, l'injection d'AAV entraîne une réponse humorale forte contre la capside (Rudich et al., 2000) (Chirmule J.Virol 2000), si bien qu'une nouvelle injection d'un même vecteur ne peut donner lieu à un transfert de gène efficace pendant plusieurs mois. Il est par contre possible de transférer à plusieurs reprises des gènes différents dans un même organe cible, en utilisant des sérotypes distincts (Hildinger J.Virol 2001) (Xiao J.Virol 1999). L'absence de cross-réaction entre les anticorps dirigés contre des capsides différentes (en fonction des sérotypes toutefois, (Gao et al., 2004b)) permettrait de réaliser un nouveau transfert de gène chez le patient, suite à l'extinction du gène, ou de réadministrer un second gène thérapeutique.

a. Tropisme et utilisation des différents sérotypes de l'AAV

L'AAV-2 a été le premier sérotype utilisé en transfert de gène. Il présente chez l'animal un tropisme large. L'AAVr transduit préférentiellement le muscle (Favre et al., 2000) (Snyder et al., 1997b) (Herzog et al., 1997) (Herzog et al., 1999) (Song et al., 2002), le foie (Snyder et al., 1997a) (Xiao et al., 1998) (Song et al., 2001a), la rétine ((McGee Sanftner et al., 2001) (Rabinowitz et al., 2002), et le système nerveux central ((Mastakov et al., 2001) (Kaplitt et al., 1994) de différentes espèces animales (pour revue (Snyder, 1999) (Monahan and Samulski, 2000) (Kotin, 1994) (Russell and Kay, 1999) (Flotte, 2004a)).

Des études *in vivo* ont montré que l'AAVr permettait de faire exprimer à long terme un gène marqueur ou une protéine thérapeutique après une seule administration. Plusieurs travaux réalisés dans des modèles murins et canins de maladies génétiques ont montré qu'il était possible d'obtenir une correction phénotypique plusieurs mois après l'injection, en faisant sécréter une protéine thérapeutique (CFTR, facteur IX, β -glucuronidase, γ -sarcoglycan, érythropoïétine), à partir du muscle ou du foie principalement (cf. *infra*).

Comme présenté plus haut, la littérature décrit neuf sérotypes utilisés en transfert de gène à l'heure actuelle (Gao et al., 2004b). D'autres clones sont identifiés et testés actuellement en tant que vecteur (Gao et al., 2004b). Les études séroépidémiologiques indiquent que les sérotypes 2, 3 et 5 sont endémiques chez l'homme (une étude, de faible ampleur toutefois, montre que peu de personnes ont des anticorps dirigés contre l'AAV-5 (Hildinger et al., 2001), alors que l'AAV-4 infecte essentiellement les primates. L'AAV-4 est retrouvé naturellement chez le Vervet (Singe vert) (Kaludov et al., 2001).

En rapport avec notre sujet d'étude, nous présenterons les caractéristiques du transfert de gène dans le muscle médié par l'AAV, puis les essais de transfert du gène de l'Epo dans des modèles petits et gros animaux.

L'intérêt des différents sérotypes est leur tropisme propre en fonction du type cellulaire cible. Ceci est à relier aux récepteurs cellulaires impliqués lors de la fixation. Ils ne sont pas identifiés pour tous les sérotypes.

b. Transfert de gène dans le poumon

Le poumon et plus particulièrement l'épithélium respiratoire a été le premier organe cible de transfert de gène au moyen d'AAV recombinants. Le prévalence de la mucoviscidose en France et aux Etats-Unis en est la cause principale. C'est une maladie autosomale récessive. Le gène impliqué dans la maladie est localisé sur le chromosome 7 et code pour le CFTR (« *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* »), protéine canal régulée par l'AMPC et impliquée dans la réabsorption des ions Cl^- et la régulation du potentiel

transmembranaire au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales (Wagner et al., 2002), (Welsh and Smith, 1993). Le déficit en CFTR est lié à une mutation/délétion au niveau du résidu Phénylalanine 508. Les symptômes et notamment la déficience respiratoire plus ou moins forte sont dus à une atteinte inflammatoire de l'épithélium respiratoire, compliquée par des infections microbiennes et destruction progressive du poumon avec fibrose.

Les sérotypes testés dans le poumon sont majoritairement le 2 et le 5, et de façon plus sporadique le sérotype 4 (Zabner et al., 2000). Il faut noter que l'AAV-4 ne transduit pas le poumon, du fait d'une inhibition de l'infection par la mucine sécrétée et transmembranaire (Walters et al., 2002). La fixation de la mucine à la particule virale est due à la présence d'acides sialiques sur des oligosaccharides O-liés, auxquels se fixe spécifiquement l'AAV-4 (Walters et al., 2001).

Zabner et al (Zabner et al., 2000) ont montré que l'AAV-5 avait un taux de transduction de l'épithélium pulmonaire supérieur à l'AAV-2. Ils montrent surtout que la fixation de l'AAV-5 au pôle apical des cellules épithéliales est 10 fois plus efficace que celle de l'AAV-2. L'AAV-4 quant à lui se fixe sur les cellules mais n'a pas un taux de transduction supérieur à l'AAV-2. Ils infectent pour cela avec des vecteurs codant pour la β -galactosidase des cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires primaires différenciées. Ces différences sont reproduites chez la souris après administration intra nasale. L'AAV-2 peut par contre transduire les cellules épithéliales pulmonaires après fixation au pôle baso-latéral avec un rendement proche de l'AAV-5. Les récepteurs mis en jeu sont différents, puisque la transduction par l'AAV-2 est inhibée par compétition avec l'héparine alors que celle de l'AAV-5 ne l'est pas. Le mauvais accès de la face baso-latérale *in vivo* n'est pas en faveur de l'utilisation préférentielle du sérotype 2 chez l'animal. L'équipe d'Engelhardt (Ding et al., 2003) montre que l'étape limitante pour la transduction de l'AAV-2 après infection au pôle apical n'est pas seulement la conversion de l'ADN simple brin en double brin, mais la dégradation des particules virales par la voie du protéasome. L'infection *in vitro* sur le même type cellulaire que dans l'étude précédente en présence de LLnL (N-acétyl-L-leucyl-L-leucyl-norleucyl), un inhibiteur du protéasome, donne un niveau d'expression du transgène 100 fois plus élevé. Le sérotype 5 est affecté dans les mêmes proportions par cette voie de dégradation. Celle-ci ne semble rentrer en jeu qu'après infection par le pôle apical. En effet, l'infection en présence de LLnL par le pôle baso-latéral ne change pas le taux de transduction, que ce soit pour le sérotype 2 ou le sérotype 5. La molécule utilisée n'affecte pas la conversion de l'ADN

simple brin en double brin. Les auteurs utilisent en effet des vecteurs véhiculant l'ADNc de la GFP ayant encapsidé un génome double brin, soit fusion passive de deux génome simple brin, soit deux génomes liés par liaison covalente au niveau d'un ITR et fusionnant en formant un *hairpin* (formes minoritaires). Ces vecteurs augmentent le rendement de transduction d'un log. Ils sont par contre affectés dans les mêmes proportions que les vecteurs simple brin par la voie de dégradation du protéasome. Même si les auteurs confirment que la conversion de l'ADN simple brin en double brin est une des limites de la transduction (déjà montré dans le cerveau par le groupe de Jude Samulski (McCarty et al., 2003)), ils montrent surtout que la grande majorité des particules est détruite par la voie du protéasome. L'inhibition des voies de dégradation des vecteurs serait un point à prendre en considération chez l'animal et l'homme, sous couvert de la toxicité et des effets secondaires des molécules utilisées. Les essais de transfert de gène chez l'animal et les essais cliniques n'en sont pas encore là.

L'efficacité du transfert de gène dans les voies respiratoires a été étudié dans de nombreux modèles animaux, en particulier la souris, le lapin (Halbert et al., 1997) et le primate. De part sa taille, la voie d'abord (instillation guidée par fibroscopie), la méthode développée se voit applicable à l'homme (Weiss et al., 2002). En 1996, Conrad et al (Conrad et al., 1996) avaient montré l'innocuité de l'administration de vecteurs AAV-CFTR de sérotype 2 dans les voies respiratoires de macaques rhesus. Les animaux ont reçu 10^{11} particules par aérosolisation dans le lobe inférieur gauche. Un Transfert de gène à long terme est possible puisque le transgène est détectable en PCR 6 mois après l'instillation du vecteur.

Le gène codant pour le CFTR est un gène long et son utilisation a posé problème lors de ses premières utilisations au sein d'un vecteur AAV au regard de sa faible capacité d'encapsulation. Les premiers ADNc utilisés (4,4 kb) laissaient peu de place pour un promoteur et un signal de polyadénylation, si bien que les vecteurs AAV-CFTR évalués par Terry Flotte (Flotte et al., 1993a), (Flotte et al., 1993b) utilisaient l'ITR de l'AAV comme promoteur. Des versions plus courtes de l'ADNc ont été obtenues plus tard et évaluées avec le promoteur p5 de l'AAV sauvage (Zhang et al., 1998) ou le promoteur de la thymidine kinase (Wang et al., 1999a).

Des essais cliniques de phase I et II ont été initiés chez des patients atteints de mucoviscidose modérée ou plus sévère (Flotte et al., 1996) (Wagner et al., 1998) (Aitken et al., 2001) (Wagner et al., 2002) (Flotte et al., 2003). Les vecteurs ont été administrés soit dans

le poumon par nébulisation (Aitken et al., 2001) ou par instillation après bronchoscopie (Flotte et al., 1996) (Wagner et al., 1998) ou par instillation dans les fosse nasales ou les sinus (Flotte et al., 2003) (Wagner et al., 2002). Les vecteurs utilisés dans ces études utilisent la version complète de l'ADNc du CFTR sous contrôle de l'ITR. Ces études confirment en partie celles faites chez l'animal et en particulier le macaque en ce qui concerne l'innocuité de l'AAV. Le vecteur est bien toléré quelle que soit la dose injectée (jusqu'à 10^{13} particules pleines : (Aitken et al., 2001)) et les effets secondaires observés chez les patients seraient plus à relier à la maladie ou à l'acte d'injection qu'au vecteur lui-même. Toutefois mêmes si certains patients montrent une amélioration transitoire de quelques paramètres d'évaluation pulmonaire (Aitken et al., 2001), il est impossible de corriger complètement et à long terme les symptômes de la maladie. La transduction de l'épithélium pulmonaire par l'AAV-2 est très faible et le nombre de copies du transgène n'est pas détectable à long terme. L'étude de Aitken et al (Aitken et al., 2001) montre une nombre de copies de 0,1 à 0,6 copies par cellule à 30 jours, en fonction de la dose administrée (jusqu'à 10^{13} particules) et la transgène est indétectable en PCR 3 mois après administration. La RT-PCR ne permet pas de détecter des ARNm spécifiques du transgène. L'étude de Flotte et al (Flotte et al., 2003) donne des nombre de copie de 0,002 à 0,5 copie par cellule au niveau du lobe cible (pour des doses équivalentes à 10^{11} à 10^{12} particules pleines). La faible efficacité de transduction des cellules épithéliales pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose pourrait être due au contexte inflammatoire et à la nature solide du mucus. Le niveau d'expression du CFTR pour corriger la maladie reste inconnu, et il y a fort à parier que les niveaux obtenus avec des promoteurs forts associés avec des versions courtes du CFTR permettraient de meilleurs résultats.

Dés études récentes montrent que le sérotype 9 (Gao et al., 2004b) serait prometteur pour le transfert de gène dans le poumon.

c. Transfert de gène dans le foie

Le foie est un organe largement étudié comme cible de transfert de gène pour l'AAV. Son état de division chez le nouveau-né et la possibilité d'induire une régénération après hépatectomie en font aussi une cible pour les vecteurs rétroviraux. Ceux-ci permettent de transduire le foie avec une efficacité supérieure à l'AAV et donnent notamment une correction phénotypique dans des modèles de chiens atteints de mucopolysaccharidose (MPS) (Ponder et al., 2002) (Xu et al., 2002) (voir (Ellinwood et al., 2004) pour revue).

Il existe différentes méthodes pour transduire le foie. Les voies d'abord les plus évidentes chez les rongeurs sont l'injection intraportale et intraparenchymateuse. De plus, au regard de la situation particulière de l'organe, il est possible d'administrer les vecteurs par voie intraveineuse périphérique. L'efficacité du transfert utilisant ces différentes voies a été comparée. On considère en effet que la très grande majorité des substances injectées au niveau de la veine caudale passe en première intention par le foie. Pour une même dose de vecteurs administrée, l'injection par voie intraportale ou intraparenchymateuse donne le même taux de transduction. L'utilisation de voies veineuses périphériques donne une expression du transgène dix fois moindre (Nathwani et al., 2001). Le niveau d'expression du transgène dépend aussi du promoteur utilisé (Snyder et al., 1997a) (Xiao et al., 1998) (Nakai et al., 1999) (Nathwani et al., 2001) et de la dose de vecteurs (Snyder et al., 1999) (Wang et al., 2000b).

L'injection de 10^{10} à 10^{11} particules d'AAVr chez la souris permet un taux de transduction de 5% des hépatocytes en moyenne. Selon les études, les cellules transduites se situent près des veines centrolobulaires (Xiao et al., 1998), en région périportale (Snyder et al., 1997a) ou disséminées dans le parenchyme (Song et al., 2001a).

La transduction des hépatocytes par l'AAVr a été largement étudiée, et comme nous l'avons vu plus haut, l'ADN issu du vecteur y persiste à long terme sous forme de concatémères d'orientations diverses (orientation tête-queue prédominante) (Miao et al., 2000) (Nakai et al., 2000). Les formes intégrées sont nettement minoritaires (Nakai et al., 2000) (Nakai et al., 2001). Dans une étude en 2000, Miao et al (Miao et al., 2000) montrent par hybridation in situ que le génome de l'AAVr est détectable dans le noyau de la quasi

totalité des hépatocytes 24 heures post-injection, alors que 5 semaines plus tard, seul 5% des cellules expriment le transgène. Utilisant deux vecteurs AAVr codant pour deux transgènes distincts ils démontrent par FISH que ces vecteurs transduisent les mêmes cellules lorsqu'ils sont injectés en même temps ou à une semaine d'intervalle, mais que la fréquence des événements de transductions simultanées diminue et devient nulle si les injections sont différées de 3 semaines ou plus. Ils confirment ces résultats après avoir identifié par PCR et Southern blot des hétérodimères. Faudrait-il en conclure que la population permissive des hépatocytes à l'infection changerait avec le temps ? Une hépatectomie partielle n'augmente pas l'efficacité de transduction, suggérant que l'état de division des cellules ne joue pas un rôle prépondérant dans le processus de transduction. Il ressort globalement de cette étude que l'entrée du vecteur dans les hépatocytes n'est pas un facteur limitant. La transduction médiée par l'AAV-2 est donc limitée par des phénomènes post-entrée.

Le groupe de Mark Kay (Thomas et al., 2004) montre que le sérotype 8 a un taux de transduction environ 10 fois supérieur à l'AAV-2 (AAV-hfIX sur des souris C57Bl/6). Alors que l'injection de 3.10^{11} vg d'AAV2-EF1 α -nlsLZ donne un taux de transduction inférieur à 3% 6 semaines post-injection (par voie intra-portale) chez des souris Rag-1 (tolérantes au LacZ), la même dose d'AAV8 entraîne une transduction de plus de 10% des hépatocytes. Après entrée dans le noyau, la décapsidation des particules d'AAV-8 seraient plus rapide que celle des particules AAV-2. Trois semaines post injection, les formes nucléaires d'ADN détectables en Southern sont majoritairement des formes simple brin pour les groupes ayant reçu de l'AAV-2. Ces formes sont de plus résistantes à un traitement à la DNase et détectées après précipitation par l'anticorps A20 (reconnaissant les capsides intactes). Ces données suggèrent que de l'ADN sous forme encapsidé persiste dans le noyau 3 semaines après injection. Aucune forme simple brin n'est détectée chez les animaux ayant reçu de l'AAV-8, l'ADN est retrouvé sous forme double brin monomérique ou concatémérique. La décapsidation des particules d'AAV-2 apparaît donc comme un processus beaucoup plus long que pour le sérotype 8. Ceci expliquerait la cinétique d'expression plus rapide de ce dernier. Les auteurs montrent de plus que la décapsidation s'effectue dans le noyau, en plaçant des particules en contact avec des extraits cytoplasmiques ou nucléaires. Même si les phénomènes d'entrée ne sont pas bien connus et pourraient varier d'un sérotype à l'autre, le taux de transduction inférieur du sérotype 2 pourrait être du à un rendement de décapsidation faible comparé à l'AAV-8.

Il n'en reste pas moins que la décapsidation est une des étapes limitantes de la transduction médiée par l'AAV. La conversion du simple brin en double brin l'est aussi comme nous l'avons montré dans la partie « Conversion du génome simple brin en double brin ».

L'étude montre également que le nombre de copies du transgène dans le noyau des hépatocytes augmente au cours des 6 premières semaines après injection d'AAV-8, alors que ce n'est pas le cas pour l'AAV-2. Ceci suggère que la phase de migration vers le noyau est longue. Les voies de migration dans les endosomes sont décrites comme rapides (cf. partie « Voies d'entrée et trafic intracellulaire de l'AAVr »), ceci signifierait que la phase d'entrée dans le noyau serait longue. Ainsi dans le modèle de Mark Kay (Thomas et al., 2004), du moins pour le sérotype 8 dans des hépatocytes, l'entrée dans le noyau s'étalerait sur au moins 6 semaines, alors que la décapsidation des particules entrées serait rapide et conduirait rapidement à la formation de formes double brin stables.

La réadministration d'un même sérotype étant d'efficacité limitée à cause de la réponse humorale contre la capsid du vecteur (Chirmule et al., 2000) (Xiao et al., 1999), le groupe de J. Wilson proposait une méthode de repopulation hépatique afin d'augmenter le taux de transduction (Chen et al., 2001). Après injection par voie intraportale chez des souris d'un AAVr véhiculant le gène bcl-2, ils administrent à l'animal l'anticorps Fas 5 à 6 semaines plus tard. Il a déjà été documenté que celui-ci, en se ligant au marqueur de surface CD 95, entraîne normalement l'apoptose et que celle-ci est inhibée en présence de Bcl-2. L'injection d'anticorps Fas s'accompagne ici d'une augmentation de l'expression de bcl-2 et d'une augmentation du nombre de copies du vecteur par cellule. Deux mois après l'infection, le taux de transduction a même progressé d'un facteur 10 (progressant de 2 à 20%). Cette technique n'a pourtant pas été reprise par la suite.

Le foie a été utilisé à maintes reprises comme organe sécréteur de protéines thérapeutiques après injection par voie intraportale, intraveineuse périphérique ou intraparenchymateuse (fIX (cf. infra), fVIII (Scallan et al., 2003), α -Galactosidase (Ziegler et al., 2004), (Park et al., 2003), β -glucuronidase (Sferra et al., 2004). Les niveaux de sécrétion atteints permettent une correction du phénotype chez des modèles petits et gros animaux de maladies génétiques. C'est le cas de l'hémophilie B, maladie largement étudiée par les groupes de Kathy High et Mark Kay (voir également partie « Transfert de gène dans le muscle »). L'hémophilie est un trouble de la coagulation due à un déficit en facteur IX fonctionnel dans le cas de

l'hémophilie B et en facteur VIII dans le cas de l'hémophilie A. Les thérapies actuelles consistent en des transfusions en réponse à des épisodes hémorragiques et à l'administration de facteur de coagulation recombinant. Dans le cas de l'hémophilie B, un taux sanguin de facteur IX ramené à 1% permet de réduire le phénotype de la maladie de sévère à modéré, avec notamment des saignements spontanés moins fréquents. Un taux de 5% rend l'atteinte modérée. Dans ce cas, les injections de facteur IX ne sont indispensables que lors d'hémorragies prononcées (blessures graves, chirurgies...). A l'heure actuelle, 3 à 4% des patients traités par injection de facteur IX recombinant développent des anticorps contre la protéine. La réponse immune apparaît d'autant plus facilement que les mutations dans la séquence codante du facteur IX sont importantes. Plusieurs modèles animaux sont disponibles : un modèle de souris knock-out (Lin et al., 1997) et deux modèles de chiens. Une colonie (*UNC-Chapell Hill*) présente une mutation faux-sens dans le site catalytique de la protéine (Guanine remplacée par une Adénine, remplaçant le résidu Glycine 379 par un Acide glutamique (Evans et al., 1989)). Bien que le gène et les ARNm soient détectables en Southern et Northern, l'antigène est donc présent dans le serum sans que l'on puisse le doser par ELISA. Une autre colonie de chiens (*Auburn*) (Mauser et al., 1996)) présente une mutation non sens (délétion de paires de base aboutissant à un codon stop au niveau du résidu 146 avant le peptide d'activation). Snyder et al (Snyder et al., 1999)) ont montré qu'il était possible d'avoir une sécrétion stable et une correction phénotypique (diminution du temps de saignement après caudectomie) à long terme chez la souris (suivi jusqu'à 17 mois) après injection intra-portale ou par voire IV périphérique. Les souris ont par contre développé des anticorps contre le facteur IX, le cDNA du facteur IX étant ici d'origine humaine. Une construction dérivée (ADNc du facteur IX canin sous contrôle d'un promoteur MFG) a été utilisée chez le chien après injection intra portale. Les taux de facteur IX sécrétés sont stables sur 8 mois mais ne permettent qu'une correction phénotypique partielle (0,5 à 1 % du taux physiologique). Plus tard, Wang et al (Wang et al., 2000b) utilisent la même colonie de chiens présentant une mutation faux sens. Les doses de vecteurs injectées par voie intra portale sont comparables à celles utilisées dans l'étude précédente, mais l'ADNc du facteur IX canin est placé sous le contrôle d'un promoteur chimère spécifique du foie (promoteur LSP : promoteur de la *thyroid hormone-binding globulin* fusionné à deux répétitions des séquences enhancer de l' α 1-microglobuline/bikunine). Les taux sécrétés (5% du taux physiologique) sont stables sur la durée de l'étude (7 mois) et permettent une correction phénotypique (diminution des temps de coagulation total et de thromboplastine activée sans épisodes de saignement pendant la durée de l'étude). Les animaux n'ont pas présenté d'anticorps anti-facteur IX. Ils avaient

montré un an auparavant (Wang et al., 1999b) que la même construction (fIX canin sous contrôle du promoteur LSP) permettait une correction phénotypique sur 5 mois, sans développement d'anticorps anti-facteur IX. Le type de mutation des chiens et la circulation au préalable de l'antigène participe sûrement à la tolérance de la protéine produite par transfert de gène. Mais ce modèle n'est sûrement pas représentatif de la diversité des mutations que l'on retrouve chez l'homme. Comme nous le présentions plus haut, les patients atteints de mutations larges dans la séquence codante développent plus facilement une réponse immune contre la protéine recombinante. Il est probable qu'il en serait de même après transfert de gène. Mount et al (Mount et al., 2002) ont utilisé la souche de chiens *Auburn* présentant une mutation non sens. Ces animaux développent une réponse immune contre le facteur IX lorsque celui-ci est transféré dans le muscle (cf. partie «Transfert de gène dans le muscle»). Les auteurs utilisent ici aussi un promoteur chimère : promoteur de l'alpha anti-trypsine humaine fusionnée à un enhancer dérivé de l'apolipoprotéine E. Après injection par voie intraportale, deux chiens sur trois sécrètent des taux de facteur IX compris entre 5 et 12% du taux physiologique avec correction phénotypique sur une période de 70 semaines. Un animal a présenté des anticorps anti facteur IX 5 semaines post-injection. Ces résultats sont tout de même encourageants quant au traitement de patients chez lesquels la protéine ne circule pas.

Il faut noter que dans toutes ces études, aucun chien n'a présenté d'élévation du taux de transaminases hépatiques (sauf un chien dans les 3 à 5 jours suivant l'injection, mais qui a présenté une persistance de l'expression).

Ces résultats ne sont à l'heure actuelle pas transposables chez l'homme. Des essais cliniques (K.High, non publié) concernent des patients présentant des mutations faux sens (donc à priori peu sujets à des réponses immunes contre le facteur IX). Ces essais sont faits avec un vecteur AAV-2 injecté par voie intra artérielle (au niveau de l'artère fémorale), L'ADNc du facteur IX humain étant sous contrôle d'un promoteur dérivé de l'alpha anti-trypsine humaine. Les essais actuels sont freinés suite à des complications observées chez un patient qui a présenté une expression transitoire de facteur IX. Ses taux sanguins de transaminases hépatiques ont augmenté 4 à 5 semaines après l'injection et les taux de facteur IX sécrétés ont diminué en parallèle. Le patient n'a pas développé de réponse humorale contre le facteur IX. Le groupe de K.High a montré en ELISPOT IFN γ une réponse immune cellulaire contre un épitope de la capside d'AAV-2 (Flotte, 2004b) et du facteur IX. Ce même groupe a également montré qu'après injection intra portale chez la souris, la capside de

l'AAV-2 restait détectable d'un point de vue immunologique entre la première et la quatrième semaine (D.Sabatino, non publié). Ces résultats amènent quelques questions quant à l'utilisation de ce vecteur à des doses fortes chez l'homme. Le développement d'une réponse cellulaire pourrait être dû à la réactivation d'une réponse immune préexistante suite à l'infection par de l'AAV-2 sauvage dans l'enfance. Toutefois la réponse immune avant injection n'a pu être étudiée, nul doute qu'elle le sera chez les prochains patients et que les doses injectées seront moindres (K.High, essais en cours, non publié). Dans l'hypothèse où la réponse cellulaire est due à une infection au préalable par le virus sauvage, ne pourrait-on pas penser que ces phénomènes pourraient être évités en utilisant des sérotypes n'infectant pas l'homme, comme l'AAV-8 qui présente de plus l'intérêt de transduire plus efficacement le foie ? Cependant ce sérotype n'est en qu'au stade pré-clinique chez des modèles petits animaux. Aucun essai clinique n'utilise de sérotypes autres que le sérotype 2. L'AAV-8 n'a été testé à l'heure actuelle que sur un modèle murin d'hémophilie A (Sarkar et al., 2004)(cf. infra), avec succès.

Grimm et al (Grimm et al., 2003b) ont comparé l'efficacité de transduction des vecteurs AAV-1 à 6 codant pour du facteur IX humain après injection intraveineuse périphérique et intra portale chez la souris. Pour une dose injectée de 2.10^{12} particules pleines, ils obtiennent des taux de facteur IX exprimés considérables (134,9 $\mu\text{g/mL}$, soit 2700% du taux physiologique). Ce résultat est d'autant plus surprenant que les protéines de capsid de AAV-1 et -6 diffèrent par seulement 6 acides aminés. Les vecteurs pseudotypés sont donc de bons candidats pour le transfert de gène dans le foie. Il est intéressant de noter que dans l'étude récente de Gao et al (Gao et al., 2002) l'AAV-8 était le sérotype le plus efficace pour transduire le foie, devant le sérotype 7, les sérotypes 5, 2 et 1 étant les moins bons candidats. Sarkar et al (Sarkar et al., 2004) obtiennent les mêmes résultats dans un modèle murin d'hémophilie A après injection des vecteurs codant pour du facteur VIII par voie IV périphérique (veine caudale) ou intra portale, avec des stratégies à un ou deux vecteurs (où les chaînes légère et lourde du facteur VIII sont véhiculées par deux vecteurs différents). Il faut aussi remarquer qu'au regard des études sérologiques, les sérotypes autres que le 2 semblent être rares chez l'homme (Gao et al., 2002) (Xiao et al., 1999) (Hildinger et al., 2001). Toutefois, dans l'étude de Grimm et al (Grimm et al., 2003b), les quantités de facteur IX sécrétées avec les sérotypes testés ne sont pas significativement supérieures à l'AAV-2. Pourtant, Mingozzi et al (Mingozzi et al., 2002) montrent que l'AAV-5 est 25 fois plus efficace que l'AAV-2 et Rabinowitz et al (Rabinowitz et al., 2002) concluent que les

sérotypes 1, 3 et 5 sont plus efficaces que l'AAV-2. Au contraire, Grimm et al montrent sur un suivi de 3 mois que l'expression maximale due à l'AAV-1 est comparable à l'AAV-2 et que le sérotype 6, à priori le plus efficace, donne seulement des taux de facteur IX 1,3 fois plus élevés que l'AAV-2. Les écarts entre ces différents travaux peuvent avoir des causes diverses. Bien sûr, même pour les protocoles proches, les résultats peuvent varier d'un laboratoire à l'autre, mais il faut surtout garder à l'esprit que la méthode utilisée a un impact sur la conclusion. Par exemple, l'étude de Rabinowitz et al (Rabinowitz et al., 2002) prend seulement en compte une dose de vecteurs et compare l'expression du transgène à un temps donné. Aussi, dans l'étude faite par le groupe de Wilson, l'AAV-2 n'a pas été purifié de la même façon que les autres sérotypes (iodixanol/héparine contre gradient de chlorure de césium). Ils concluent que l'AAV-8 transduit 100 fois mieux le foie que l'AAV-2. Faudrait-il pour cela remettre en doute leurs conclusions ? Le groupe de Mark Kay montre aussi que l'AAV-8 est le sérotype le plus efficace pour le transfert de gène dans le foie chez la souris. Il montre de plus que des vecteurs de sérotype 2 purifiés sur gradient de CsCl ou HPLC ont le même rendement d'infection. Enfin notons que la variété des transgènes utilisés (haAT, hfIX, LacZ) peut induire des variations dans la quantification de l'expression (expression et/ou sécrétion différentes...). Néanmoins toutes les études concluent que le sérotype 8 est le plus efficace pour le transfert de gène dans le foie chez le rongeur. Il doit maintenant être testé dans des modèles grands animaux.

d. Transfert de gène dans la rétine

La rétine est également un organe de choix pour le transfert de gène. Même si les lentivirus et notamment les vecteurs dérivés du SIV semblent efficaces pour le transfert de gène dans la rétine (évaluation chez le rat, (Duisit et al., 2002)), nous ne développerons ici que les essais de transfert de gène médiés par l'AAV.

L'AAVr permet un transfert de gène stable dans la rétine de chien (4 ans) et de primate (2 ans) (F.Rolling, non publié).

L'efficacité des sérotypes 1 à 5 a été comparée chez le rat par le groupe de Fabienne Rolling en collaboration avec le laboratoire de Jude Samulski. Les vecteurs véhiculant l'ADNc de la GFP sous contrôle d'un promoteur CMV ont été injectés en sous rétiniens (création d'un décollement de rétine se matérialisant par une bulle entre la neurorétine et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)). L'expression du transgène peut être suivie in situ par photographies de fonds d'œil. Les sérotypes 4 et 5 permettent un taux de transduction largement supérieur au sérotype 2, l'expression obtenue avec le sérotype 5 serait même plus forte qu'avec le sérotype 4 (Rabinowitz et al., 2002).

Il est possible de cibler le type cellulaire transduit. Lotery et al (Lotery et al., 2003) ont montré que le sérotype 5 transduisait de manière préférentielle les bâtonnets dans la rétine de primate. Weber et al (Weber et al., 2003) ont montré par la suite que les profils de transduction des sérotypes 4 et 5 sont conservés chez le rat et le chien. Après injection sous rétinienne, ils permettent de transduire respectivement l'EPR seul ou l'EPR et la neurorétine. L'AAV-4 permet également de cibler le RPE chez le primate. Ceci présente un grand intérêt quant à l'utilisation de ce vecteur pour traiter des affections concernant spécifiquement un type cellulaire. Par exemple, l'Amaurose congénitale de Leber (LCA pour *Leber Congenital Amaurosis*) provoque une cécité précoce chez le nourrisson. Les causes en sont diverses, des mutations dans différents gènes peuvent être impliquées (10 gènes différents impliqués, dont RPE65, CRX, RETGC, GUCY2D, CRB1 pour les principaux) (Hanein et al., 2004). Des mutations dans le gène RPE65 sont à l'origine des formes les plus graves de la maladie et sont retrouvées chez 10 à 15% des patients atteints de LCA. Ce gène code pour une protéine présente dans l'EPR. Un modèle canin (Aguirre et al., 1998), porteur d'une mutation dans les deux copies du gène RPE65, reproduit une forme particulière de la maladie. Le groupe de Jean Bennett évalue l'efficacité du transfert du gène RPE65 sous contrôle d'un promoteur dérivé du RPE65 humain (construction de 0,8 kb) à l'aide de vecteurs de sérotypes 1, 2 et 5 (Aguirre, non publié). Une correction phénotypique est obtenue après injection sous rétinienne d'AAV-5. Des électrorétinographies (REG) pratiquées 13 mois post-injection sont normales. L'efficacité du traitement ne varie pas quel que soit l'âge de l'animal lors de l'injection (4-5, 7 ou 10-11 mois). Toutefois ces résultats peu détaillés et non publiés pour l'instant ne montrent pas le pourcentage de réussite du traitement parmi tous les chiens traités, mais montre tout de même qu'il est possible de retrouver une rétine fonctionnelle à long terme chez quelques chiens. Déjà le même groupe avait publié des résultats similaires avec de l'AAV-2 (Acland et al., 2001). L'ADNc du RPE65 canin était placé sous contrôle d'un

promoteur CAG (promoteur de la β -actine de poulet fusionné avec l'enhancer du promoteur précoce du CMV). Dans ce modèle, la perte de vision est due à une délétion de 4 paires de base créant un changement de phase et un codon stop. La protéine est détectable dans les cellules de l'épithélium pigmentaire par Western Blot chez un animal 13 mois après injection sous rétinienne. Des ERG pratiquées sur des chiots de 4 mois traités montre une activité rétinienne proche de la normale. Le groupe de Fabienne Rolling se propose de reproduire ces résultats en Europe sur une autre colonie de chiens développée par C.Hamel avec de l'AAV-4.

D'autres modèles d'affections rétiniennes sont utilisés, notamment un modèle murin de dystrophie rétinienne due à un déficit en *peripherin-2* (Prph2) dans les photorécepteurs (Ali et al., 2000)). Les mutations dans le gène Prph2 sont connues pour être responsables de nombreuses formes de dystrophie rétinienne, dont la rétinite pigmentaire et la dystrophie maculaire. Après injection sous rétinienne d'AAV-2 codant la Prph2 sous contrôle d'un promoteur rhodopsine, les souris présentent des ERG proches des animaux sauvages ainsi qu'une reconstitution des articles externes des photorécepteurs visible en microscopie électronique à transmission et balayage respectivement 4 et 6 semaines post injection. La morphologie des segments externes néoformés, leur interaction avec le RPE et l'évidence de la formation de disques des photorécepteurs suggère que leur métabolisme est normal.

Le groupe de Robin Ali travaille sur d'autres modèles murins de néo vascularisation rétinienne. Les phénomènes d'angiogenèse rétinienne sont une des causes majeures de cécité, impliqués notamment dans les cas de rétinopathie diabétique et de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF pour *vascular endothelial growth factor*) joue un rôle critique dans l'angiogenèse. Son expression est favorisée en cas d'hypoxie *in vivo* et *in vitro* ; cette caractéristique est utilisée pour créer des modèles de néovascularisation rétinienne. Des souris C57Bl/6 sont placées dans un environnement appauvri en oxygène (75% du taux normal d'oxygène) entre les jours 7 et 12 suivant leur naissance. Ceci induit une oblitération des capillaires rétiniens au pôle postérieur et une néo vascularisation pré-rétinienne qui atteint son maximum entre J17 et J21, puis qui régresse ensuite spontanément. Cette période courte a été utilisée comme modèle de rétinopathie ischémique dans deux études successives. L'une exploite l'affinité du VEGF avec son récepteur Flt-1 (Bainbridge et al., 2002). Celui-ci est présent à la surface des cellules endothéliales et la fixation du facteur de croissance induit une prolifération cellulaire, une

migration et une vaso-perméabilité accrue. Une forme soluble du récepteur au VEGF, le sFlt-1, généré par épissage alternatif, permet d'inhiber l'action du VEGF. Son activité angiostatique est due d'une part à la séquestration du VEGF avec qui il se fixe avec une grande affinité et la formation d'hétérodimères avec les récepteurs membranaires au VEGF Flt-1 et KDR. L'injection intravitréenne à J2 d'AAV-2 codant pour le sFlt-1 sous contrôle du promoteur CMV inhibe la néovascularisation. L'autre étude utilise un système de régulation répondant à l'hypoxie (HRE pour *hypoxia-responsive element*) (Bainbridge et al., 2003). Ce système, inséré dans un AAV-2, a été cloné en amont de l'ADNc de la GFP. Les vecteurs ont été injectés par voie intravitréenne à J2 et l'expression a été étudiée en microscopie à fluorescence après énucléation des animaux à J19 (phase de néo vascularisation) et J34 (arrêt de la phase de néo vascularisation et architecture vasculaire normale), en comparaison à un vecteur CMV-GFP. Dans le modèle d'ischémie, l'expression de GFP à J19 est localisée dans la neurorétine au pôle postérieur, avec une distribution typique des phénomènes ischémiques dans ce modèle. A J34, l'expression de la GFP est faible et limitée à quelques cellules. Le même système de régulation d'expression a été utilisé dans un modèle de néo vascularisation choroïdienne induite au laser. Cette technique permet de rompre la membrane de Bruch qui induit la croissance de nouveaux vaisseaux dans l'espace sous rétinien à partir de la choroïde. Les vecteurs ont été injectés par voie sous rétinienne 4 semaines avant la rupture de la membrane au laser. L'expression de la GFP est détectable 7 semaines après application du laser au niveau des lésions induites, alors qu'elle est quasi indétectable 3 semaines plus tard. Cette étude montre qu'il est possible de contrôler l'expression d'un transgène par un système répondant à l'hypoxie dans des modèles de néovascularisation rétinienne et choroïdienne. Le système HRE peut être activé par des facteurs de transcription induits par le stress cellulaire ou de manière plus spécifique par le facteur HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*). Ce facteur aurait d'ailleurs une affinité pour un enhancer présent au niveau des gènes codant pour le VEGF et l'érythropoïétine notamment.

Des cas de rétinite pigmentaire sont attribuables à des mutations du gène *Mertk*. La maladie se caractérise par une cécité nocturne (héméralopie) chez l'enfant qui progresse rapidement vers une perte de vision périphérique, jusqu'à ce que seule une partie de la vision centrale soit conservée. Ce gène, normalement exprimé dans le RPE code pour un récepteur à la tyrosine kinase qui joue un rôle dans la reconnaissance et la fixation des débris des articles externes des photorécepteurs. En l'absence de protéine MERTK fonctionnelle, les débris des articles externes s'accumulent dans l'espace sous rétinien entraînant une dégénérescence des

photorécepteurs. Le modèle de rat RCS (*Royal College of Surgeons*) mime cette affection. Smith et al (Smith et al., 2003) montrent que les photorécepteurs sont partiellement fonctionnels 6 semaines après injection sous rétinienne d'AAV2-CMV-MERTK ou RPE-MERTK. La correction semble plus prononcée avec le promoteur CMV. La survie des photorécepteurs est prolongée après le traitement (jusqu'à 9 semaines post-injection), même si la dégénérescence des photorécepteurs n'est pas totalement empêchée. L'inefficacité partielle du traitement peut aussi tenir au modèle lui-même (rapidité de la dégénérescence des photorécepteurs après la naissance). L'étude montre en effet que la majorité des photorécepteurs n'est plus fonctionnelle 13 semaines post partum.

e. Transfert de gène dans le cerveau

Le système nerveux central est un des organes cibles de l'AAV. Le cerveau fait partie des organes cibles testés récemment avec l'AAV. En 1998, l'équipe de Jude Samulski montre qu'après injection dans le cerveau de souris, l'AAV-2 transduit préférentiellement les neurones (Bartlett et al., 1998). Les astrocytes et la microglie sont transduits avec un rendement beaucoup plus faible.

Les autres sérotypes transduisent également les cellules nerveuses et il apparaît que le type cellulaire cible varie en fonction du sérotype utilisé (Davidson et al., 2000). L'injection dans un ventricule latéral d'AAV-4 et d'AAV-5 véhiculant l'ADNc de la β -Galactosidase sous contrôle du promoteur RSV permet de transduire de façon stable les cellules épendymaires. Ce type cellulaire est le seul transduit par le sérotype 4 puisqu'après injection dans le striatum les cellules du parenchyme ne sont pas transduites. L'administration d'AAV-5 par la même voie permet de transduire non seulement les cellules épendymaires mais également les astrocytes avec un taux de transduction nettement plus élevé que l'AAV-2. De plus, le sérotype 5 permet de transduire des cellules à distance du point d'injection. Les raisons de cette diffusion ne sont pas claires à l'heure actuelle. Il faut toutefois souligner que dans cette étude faite chez la souris (Davidson et al., 2000) la cassette d'expression véhiculée par l'AAV-5 était flanquée des ITR du même sérotype alors que les vecteurs AAV-2 et AAV-4 contenaient les ITR de l'AAV-2. Ceci pourrait modifier la cinétique et/ou le niveau d'expression du transgène. Egalement, le sérotype 1 présente un taux de transduction 15 fois

supérieur à l'AAV2 après injection dans le striatum, avec une diffusion plus importante (plusieurs millimètres à partir du point d'injection chez la souris). Il présente un tropisme prédominant pour le neurone, les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) et les cellules de la microglie (Wang et al., 2003).

De manière étonnante, le groupe de John Wolfe a montré que l'AAV-5 ne permettait pas de transfert de gène dans le cerveau de chat (Vite et al., 2003).

L'AAV apparaît donc comme un vecteur de choix pour traiter des affections du système nerveux central (pour revue, voir (Tenenbaum et al., 2004)). Des modèles d'étude sont en cours : i) la maladie de Huntington (due à un déficit en huntingtine entraînant une dégénérescence progressive des neurones GABAergiques au niveau du striatum) dont les facteurs neurotrophiques BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) sont des protéines thérapeutiques dans des modèles murins induits par injection d'acide quinolinique (Kells et al., 2004), ii) la maladie de Canavan, due à une déficience en aspartoacylase (ASPA) à l'origine d'une accumulation d'acide N-acetyl-L-aspartique entraînant une dégénérescence spongiforme, et iii) le maladie de Parkinson due principalement à une perte en neurones dopaminergiques du mésencéphale qui se projettent massivement dans le striatum. La supplémentation en enzymes impliquées dans la synthèse de dopamine (TH, Tyrosine Hydroxylase et DDC, Dopa Décarboxylase également dénommée AADC pour *aromatic amino acid decarboxylase*) après transfert de gène dans le striatum, ou l'injection d'AAV-GDNF dans le striatum sont actuellement étudiés.

Une des applications du transfert de gène dans le cerveau sont aussi les surcharges lysosomales, et en particulier les mucopolysaccharidoses (MPS). La plupart d'entre elles sont dues à la perte de fonction d'hydrolases lysosomales spécifiques impliquées dans la dégradation de complexes glycoprotéiques membranaires après phagocytose ou autophagie (pour revue, (Ellinwood et al., 2004)). L'accumulation de ces substrats peu ou pas dégradés affecte la morphologie et le bon fonctionnement des cellules, tissus et organes. L'analyse histologique des tissus atteints montre clairement des lysosomes déformés occupant la quasi-totalité du cytoplasme. Les types cellulaires atteints sont très variés si bien que les malades présentent la plupart des atteintes neurologiques, musculaires, cardiovasculaires, oculaires, osseuses, hépatiques. Les patients présentent dans 60% des cas des atteintes du système

nerveux central. Ces maladies évoluent vers la chronicité et conduisent souvent, en l'absence de traitement, à la mort à l'âge adulte.

La thérapie peut passer par l'administration d'enzyme recombinante. Toutefois la protéine franchit avec difficulté la barrière hémato-encéphalique. La greffe précoce de cellules souches hématopoïétiques ou de sang de cordon (Muenzer and Fisher, 2004) donnent de bons résultats dans les cas de MPS I chez des enfants présentant peu ou pas d'atteinte du système nerveux central.

Les enzymes transitent dans le trans-Golgi jusqu'aux endosomes précoces liées à un récepteur au mannose 6-phosphate (M6Pr). Celui-ci est recyclé dans le Golgi à partir des endosomes tardifs. L'enzyme est ensuite active dans les lysosomes. Une faible partie échappe au transit vers le compartiment endosomal et passe dans le milieu extracellulaire par exocytose. Elle peut être recaptée à distance par le même récepteur au mannose 6-phosphate et cheminer après endocytose jusqu'au compartiment endosomal (pour illustration, (Muenzer and Fisher, 2004), (Ellinwood et al., 2004)). Ce phénomène de sécrétion / recapture est à la base des essais de thérapie génique puisqu'il est possible de toucher des types cellulaires variés après transduction d'un seul organe.

De très nombreux modèles animaux murins, canins et félin sont disponibles (Ellinwood et al., 2004), les plus utilisés sont les modèles murin et canin de MPS de type VII (déficit en β -glucuronidase, *GUSB*), bien que cette affection soit l'une des surcharges lysosomales les plus rares chez l'homme. D'autres modèles sont d'importance majeure, comme les modèles félin et canin de MPS I (déficit en α -L-iduronidase, *Idua*) et le modèle canin de MPS IIIB (déficit en α -N-Acetylglucosaminidase, *NaGlu*).

Dans le cas de modèles de MPSVII, même si des résultats encourageants ont été obtenus chez des souris nouveaux-nés après injection intraveineuse de vecteurs AAV-2 (Daly et al., 1999) (Daly et al., 2001), ces résultats n'ont pu être reproduits chez des souris adultes (Watson et al., 1998). Dans le modèle canin, les vecteurs dérivés des rétrovirus restent les plus efficaces. Le transfert de gène au moyen de vecteurs rétroviraux chez des chiots nouveaux-nés permet de transduire efficacement le foie à la faveur de la division cellulaire en post partum. Même si cette stratégie permet d'obtenir des taux élevés d'enzymes (50 à

6000 % du taux physiologique) et de corriger le phénotype d'organes à distance, l'enzyme sécrétée ne peut atteindre le système nerveux central (Ponder et al., 2002) (Xu et al., 2002). Le choix des vecteurs rétroviraux impose de travailler sur des animaux nouveaux-nés dont les hépatocytes sont au stade de division. Est-ce vraiment applicable dans une optique clinique ? Il faut aussi préciser que la barrière hémato-encéphalique des souris reste perméable dans les deux premières semaines de vie et que cette particularité physiologique participe aux résultats encourageants obtenus dans cette espèce (Ponder et al., 2002).

Comme nous l'avons montré plus haut, l'AAV permet à l'inverse de transduire le cerveau d'animaux adultes. L'AAV-1 véhiculant l'ADNc de la β -glucuronidase humaine sous contrôle du promoteur homologue et injecté à des souris nouveau-né MPS I permet une correction phénotypique de la totalité de l'organe sur un an (Passini et al., 2003). L'AAV-5 injecté dans le cerveau de chiots de 6 semaines normaux ou atteints de MPSI permet un transfert de gène efficace (Desmaris et Ciron, soumis).

f. Transfert de gène dans le muscle squelettique

Organe plus accessible, le muscle est aussi une cible de choix en transfert de gène. Les premiers essais chez la souris utilisaient l'ADNc de la β -galactosidase d'E.Coli comme gène marqueur, dont l'expression est détectée par immunohistochimie. De nombreuses études montrent qu'il est possible de faire exprimer ce gène chez le rongeur, après transfert dans le muscle quadriceps ou le tibial crânial, sur au moins 6 mois (Kessler et al., 1996) (Clark et al., 1997) (Snyder et al., 1997b) (Fisher et al., 1997). Xiao et al avaient même poursuivi leur étude sur plus d'un an et demi (19 mois) (Xiao et al., 1996). L'analyse histologique des fibres montre que le taux de transduction dépasse les 50%. L'administration de hyaluronidase permet de majorer ce taux et d'augmenter l'expression du transgène (Favre et al., 2000). De manière surprenante, l'expression prolongée du transgène n'est pas associée à l'apparition d'anticorps dirigés contre la β -galactosidase, ni à l'induction d'une réponse immune cellulaire contre les fibres transduites (Fisher et al., 1997). Celle-ci constitue pourtant une protéine hétérologue. Cette particularité a été attribuée à l'AAV, qui a vite été reconnu comme un

vecteur permettant de faire exprimer à long terme une protéine hétérologue. Cette affirmation doit cependant être tempérée puisqu'à l'heure actuelle ces observations n'ont été vérifiées que chez le rongeur. Il en tiendrait donc autant à l'espèce utilisée qu'à la nature du vecteur. Les résultats sont en effet complètement différents chez le gros animal (chien et primate) (cf. infra). Il apparaît même que les résultats diffèrent en fonction de l'espèce de souris utilisée et en fonction de la dose de vecteur administrée. Si Fisher et al (Fisher et al., 1997) et Xiao et al (Xiao et al., 1996) montrent l'absence d'anticorps anti β -Gal, Clark et al (Clark et al., 1997) montrent l'apparition d'anticorps circulant chez la souris Balb/c, après injection de doses largement supérieures de vecteurs. De même, Song et al (Song et al., 1998) dans une étude comparative sur des souris immunocompétentes (Balb/c et C57/Bl6) ou non (SCID) après injection d'un AAVr codant pour l'alpha anti-trypsine humaine (haAT) ont montré que, pour une même dose injectée, seules les souris Balb/c développaient des anticorps contre le transgène. Les souris C57 développent quant à elles des anticorps anti haAT pour des doses 10 fois supérieures.

Signalons aussi que l'administration d'AAV par voie intramusculaire induit une réaction immune humorale forte contre la capside du vecteur (Chirmule et al., 2000), empêchant la réadministration de vecteurs dans le muscle contro-latéral plusieurs mois après la première injection (Xiao et al., 1996) (Clark et al., 1997).

Toutefois, ces résultats constituaient un bon en avant en vectorologie puisque auparavant aucun vecteur ne permettait de faire exprimer à long terme un transgène après injection intramusculaire. Les vecteurs adénoviraux se heurtent en effet à des problèmes de toxicité cellulaire forte et d'apparition rapide après injection. L'utilisation de rétrovirus a bien abouti à un transfert de gène à long terme dans le muscle (Naffakh et al., 1996), étude faite sur 8 mois avec de la β -glucuronidase humaine) mais elle passait par la greffe de myoblastes infectés *in vitro* (transfert de gène *ex vivo*).

Le taux de transduction dépend du type musculaire. Notamment les fibres lentes seraient mieux transduites que les fibres rapides (par l'AAV-2), en relation apparemment avec le taux d'héparan sulfate membranaire (Pruchnic et al., 2000), (Manno et al., 2003).

L'efficacité de transduction n'est pas dépendante de l'état de division des cellules. Même si des études récentes montrent que l'AAVr infecte de manière très efficace les myocytes en

régénération chez le rat (Abadie et al., 2002), les travaux précédents ont montré que le transfert de gène chez des souris nouveaux-nés ou sur des muscles en régénération après traitement chimique n'aboutissait pas à un niveau de transduction supérieur (Pruchnic et al., 2000). L'efficacité serait même diminuée (Snyder et al., 1997b). L'efficacité du transfert de gène dépendrait du stade de régénération (Abadie et al., 2002).

Si le transfert de gène médié par l'AAVr permet une expression du transgène à long terme, les formes de persistance de l'ADN ne sont pas complètement caractérisées. Bon nombre de groupes font état de concatémères d'orientation tête-queue prédominante (Snyder et al., 1997b) (Vincent-Lacaze et al., 1999) (Herzog et al., 1999), (Song et al., 2001b). A l'opposé des travaux concernant le foie, aucune forme intégrée n'a jamais été mise en évidence. Comme nous l'avons évoqué plus haut (cf. partie « Formes de persistance du génome double brin »), les travaux de Schnepf (Schnepf et al., 2003) n'ont pas montré d'intégration du vecteur après injection intramusculaire chez la souris. Tout du moins le rendement d'intégration serait en deçà du niveau de sensibilité de la méthode utilisée.

Le muscle permet de sécréter des protéines dans le système circulatoire (haAT, Epo (cf. infra), facteur IX). Il est possible d'obtenir des taux élevés et constants d'haAT après une seule injection intramusculaire chez des souris C57Bl/6 et SCID pendant un an (Song et al., 2001b). L'étude réalisée en 1998 (Song et al., 1998) par le même groupe montre que le niveau d'expression du transgène dépend de la dose de vecteur injectée. D'autres travaux se sont intéressés au facteur IX (Herzog PNAS 1997) (Herzog et al., 1999) ou à l'Epo (Snyder et al., 1997b) (Kessler et al., 1996) (Zhou et al., 1998) (Bohl et al., 1997) (Bohl et al., 1998) (Bohl et al., 2000) (Favre et al., 2002) comme gènes rapporteurs ou thérapeutiques dans des modèles petits et gros animaux.

Plusieurs groupes ont montré que les sérotypes 1, 5, 6 et 7 transduisent le muscle de façon plus efficace que l'AAV-2 (Chao et al., 2000) (Chao et al., 2001) (Gao et al., 2002) (Arruda et al., 2004) (Duan et al., 2001). L'AAV-1, et l'AAV-6 du fait de sa très grande homologie avec celui-ci, apparaissent comme les sérotypes les plus efficaces. Toutefois, les études ne s'accordent pas sur la différence d'efficacité entre l'AAV-1 et l'AAV-2. L'étude initiale du groupe de Jim Wilson (Xiao et al., 1999) montrait une augmentation de l'expression du transgène d'un facteur 2 à 10 (érythropoïétine et α_1 -antitrypsine) chez la souris (injection de 2.10^{12} vg/kg) alors que les études du groupe de Jude Samulski (Chao et al., 2000) (Chao et al.,

2001) montrent une augmentation d'un facteur 100 à 1000 après injection chez la souris de 10^{13} vg/kg d'AAV-fIX. Les derniers résultats du groupe de K.High (Arruda et al., 2004) se rapprochent de ceux du groupe de J.Wilson. Après injection de 2.10^{11} à 4.10^{12} vg/kg d'AAV-fIX chez la souris, ils observent une augmentation du taux de facteur IX sanguin d'un facteur 10 à 20. Ils confirment ces résultats chez le chien.

Le groupe de J Chamberlain (Gregorevic et al., 2004) a montré récemment que l'AAV6 administré par voie intraveineuse en présence de VEGF (facteur de croissance des cellules endothéliales) transduit des groupes musculaires squelettiques variés (masseter, fléchisseur profond des doigts, extenseur radial du carpe, biceps, triceps, cœur, diaphragme, quadriceps, tibial crânial, gastrocnémien, soléaire), ce qui permettrait d'appliquer son utilisation aux dystrophies musculaires (cf. infra). Les doses injectées sont toutefois fortes (10^{13} vg/animal).

Les groupes de K. High et M. Kay s'intéressent particulièrement à l'hémophilie B, et donc à l'utilisation de facteur IX comme protéine thérapeutique. Le groupe de K.High utilise les modèles de souris et chiens hémophiles (colonie *UNC-Chapel-Hill* présentant une mutation faux sens) présentés précédemment (cf. partie « Transfert de gène dans le foie »). Une première étude utilisant du facteur IX humain sous contrôle d'un promoteur CMV véhiculé par un AAV-2 a montré une expression à long terme du transgène (suivi sur 6 mois) chez des souris immunocompétentes saines. Cependant celles-ci développent des anticorps 3 à 4 semaines après injection, détectables sur toute la durée de l'expérience. L'expérience est poursuivie sur 5 chiens hémophiles avec un vecteur AAV-2 véhiculant l'ADNc du fIX canin sous contrôle du même promoteur CMV (Herzog et al., 1999). La sécrétion de fIX est dose dépendante : l'injection de 1.10^{12} à $8,5.10^{12}$ particules/kg sur 4 chiens permet la sécrétion à long terme du transgène (jusqu'à 17 mois) à des taux élevés. Un cinquième animal ayant reçu une dose dix fois moindre présente des taux de facteur IX sécrétés très faibles. Il montre pourtant comme les animaux ayant reçu les doses les plus fortes une correction du temps de coagulation totale à partir de la dixième semaine post injection. Toutefois, quelle que soit la dose injectée, les animaux présentent des temps de thromboplastine partiels diminués mais significativement plus long que des animaux sains. La correction (réduction des épisodes de saignements spontanés et diminution des temps de coagulation) est donc partielle. L'animal ayant reçu la dose de vecteur la plus forte a présenté des taux de facteur IX de près de 100 ng/mL, soit environ 1% du taux physiologique de fIX humain. L'apparition d'anticorps anti-fIX est transitoire et apparemment fonction de la dose injectée. Deux animaux développent

des anticorps anti-fIX, celui ayant reçu la dose la plus élevée est le seul à présenter des anticorps neutralisants. Toutefois ils deviennent indétectables 4 mois post injection. Hagstrom et al (Hagstrom et al., 2000) montre que la fusion des éléments promoteurs/enhancer du CMV avec une séquence dérivée du promoteur de l'actine musculaire humaine permet de synthétiser des quantités de fIX 2 à 4 fois supérieures chez des souris Rag-1. Cependant ce promoteur n'a pas été validé dans des études pré cliniques et les protocoles cliniques passés ont utilisé le promoteur CMV. Deux essais cliniques de phase I sont publiés par les groupes de M.Kay et K.High, le dernier utilisant 8 cas (Manno et al., 2003), dont 3 appartenant à la première étude (Kay et al., 2000). Les patients inclus dans l'étude sont sélectionnés entre autres pour le type de mutation dans la séquence codante du facteur IX (mutation faux sens) et pour ne pas avoir développé de réponse immunitaire aux injections précédentes de fIX recombinant. Après injection de 2.10^{11} à $1,8.10^{12}$ vg/kg en plusieurs points, les patients ne présentent pas des taux de fIX thérapeutiques. Un seul patient présente un taux de 1,4% 12 semaines après injection, mais ce taux redescend en dessous de 1% par la suite. Les autres patients présentent des taux sanguins inférieurs à 1% sur toute la durée de l'étude (52 semaines). Le transfert de gène est pourtant efficace ; au niveau des sites d'injection, le transgène est retrouvé par Southern Blot entre 0,5 et 4 copies par cellule 2 à 10 mois post-injection. Il faut noter qu'aucun des patients n'a développé de réponse immune contre le facteur IX. Ainsi, comme pour les essais cliniques où le vecteur est injecté par voie intra artérielle, les résultats obtenus chez l'animal ne sont pas reproduits chez l'homme. Ces résultats pourraient être améliorés en i) ajustant la dose injectée, ii) utilisant des promoteurs plus forts que le promoteur CMV dans le muscle (promoteurs RSV ou CAG notamment) et iii) utilisant des sérotypes comme l'AAV-1 notamment.

Du fait du tropisme du vecteur pour le muscle, les affections musculaires constituent des maladies cibles privilégiées. Parmi elles, les dystrophies musculaires sont les plus étudiées. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, *Duchenne muscular dystrophy*) est une maladie liée à l'X, due à une mutation dans la séquence codante de la dystrophine. Elle touche un garçon nouveau-né sur 3500. La dégénérescence et la faiblesse musculaires qui s'installent progressivement condamnent les patients au fauteuil roulant vers le début de l'adolescence. Leur espérance de vie dépasse rarement 20 ans. La DMD est due à une mutation récessive dans le gène de la dystrophine localisé sur le chromosome X. Il fait partie des gènes les plus grands connus à l'heure actuelle, avec 3 millions de paires de bases. La dystrophie musculaire de Becker (BMD) est une forme atténuée. L'atteinte est plus ou moins sévère selon que le

cadre de lecture de la dystrophine est maintenu (BMD) ou interrompu (DMD). La myopathie des ceintures (LGMD, *Limb-girdle muscular dystrophy*) est quant à elle une atteinte des sous-unités sarcoglycan α , β , γ ou δ (LGMD 2D, 2E, 2C et 2F respectivement). La dystrophine est une protéine de grande taille (427 kDa) en forme de bâtonnet localisée sous la surface interne du sarcolemme des cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Elle assure le lien entre le cytosquelette et la membrane plasmique. La fonction de la protéine est assurée par 4 domaines. L'extrémité amino-terminale se lie à l'actine F du cytosquelette. Un domaine C terminal riche en cystéine (domaine CR) ainsi que le domaine carboxy-terminal distal (domaine CT) sont liés à la membrane plasmique via des complexes protéiques associés à la dystrophine (DAP complexes - *dystrophin associated proteins complexes* - regroupant entre autres les sarcoglycans, dystroglycans et syntrophines). Le domaine central présente des répétitions de triple hélice en bâtonnet. Les protéines associées à la dystrophine assurent le lien entre la matrice extracellulaire et le réseau de cytosquelette interne. Elles stabiliseraient la membrane face aux dommages induits par les contractions musculaires (Petrof, 1998). Au niveau des jonctions neuromusculaires (plaques motrices), le lien entre l'actine F et les syntrophines et les β -dystroglycan est assuré par une molécule proche de la dystrophine : l'utrophine. En l'absence de dystrophine, la membrane subit des dommages à chaque contraction musculaire, entraînant une dégénérescence cellulaire. Les dystrophies musculaires se caractérisent par des alternances de cycles dégénérescence-régénérescence (processus caractérisé en histologie par la position centrale des noyaux), si bien qu'à un temps donné, les cellules d'un même muscle se trouvent à des stades différents. Ceci pose un problème pour le transfert de gène, différents groupes ont montré en effet que l'AAVr transduisait avec plus ou moins de succès les myocytes en régénération. Dans un modèle de nécrose induit à la notexine chez le rat, Abadie et al (Abadie et al., 2002) montrent que l'AAV-2 injecté dans la phase de régénération (5 jours après administration de notexine) a un taux de transduction plus élevé que dans les myocytes quiescents. L'injection de vecteurs dans la phase de régénération précoce (1 à 3 jours après induction de la nécrose) entraîne un taux de transduction plus faible (Abadie et al., 2002) (Snyder et al., 1997b) (Pruchnic et al., 2000). La pertinence de ces modèles de régénération reste toutefois difficile à préciser dans le cas des dystrophies musculaires.

L'utilisation de modèles murins de dystrophie de Duchenne ou de myopathie des ceintures montre qu'il est possible d'obtenir une correction phénotypique après injection d'AAV-2 dans les stades précoces de la maladie. Les animaux utilisés sont des animaux transgéniques

présentant une mutation dans la séquence codante de la dystrophine (souris mdx (Wang et al., 2000a) (Yuasa et al., 2002) (Fabb et al., 2002) (Watchko et al., 2002) (Ferrer et al., 2004)) ou une ou plusieurs sous-unités sarcoglycan (souris gsg -/- (Cordier et al., 2000), souris KO pour l' α - ou le β -sarcoglycan (Dressman et al., 2002)). IL faut préciser que, comme on l'observe chez les patients, les modèles animaux atteints de sarcoglycanopathie primaire présentent les mêmes symptômes que ceux présentant des anomalies primaires de la dystrophine (Dressman et al., 2002). La perte de fonction d'un des gènes codant pour un sarcoglycan (déficiência primaire) entraîne la déficiencia secundaria des autres sous-unités sarcoglycan. La perte secundaria en sarcoglycan, soit dans les sarcoglycanopathies, soit dans les dystrophinopathies s'opère au niveau post-traductionnel, probablement suite à un mauvais assemblage et une mauvaise stabilité des complexes dystrophine-sarcoglycan-dystroglycan. On estime que 10 à 20 % des dystrophies musculaires sans mutation dans le gène de la dystrophine sont dues à des sarcoglycanopathies primaires (Dressman et al., 2002).

Il est possible d'avoir une correction phénotypique chez des souris transgéniques présentant un déficit en γ -sarcoglycan (souris gsg-/-). Cordier et al (Cordier et al., 2000) injectent à des souris de 3 jours un AAV-2 codant pour le γ -sarcoglycan humain sous contrôle du promoteur/enhancer MCK (promoteur de la créatine kinase musculaire) (4.10^{10} vg/animal). L'expression de γ -sarcoglycan est détectable dans le muscle cible par Western Blot 6 semaines post-injection. Des animaux adultes de 3 à 6 semaines (après le déclenchement des processus de nécrose) montrent peu ou pas de foyer de nécrose et de fibrose 4 à 16 semaines post-injection. L'expression de γ -sarcoglycan est détectée au niveau du sarcolemme par immunofluorescence. Elle est corrélée à la détection de β -sarcoglycan. Toutefois, l'administration de vecteurs à des stades plus avancés de la maladie (animaux de 16 à 40 semaines) se traduit par un taux de transduction nettement plus faible et des caractères histologiques peu ou pas améliorés. Plus tard, Xiao et al utilisent un modèle naturel de Hamster (souche Bio 14.6) présentant un déficit en δ -sarcoglycan (Xiao et al., 2000). L'injection intramusculaire d'AAV-2 codant pour le δ -sarcoglycan humain sous contrôle d'un promoteur CMV chez des animaux adultes permet la restauration de la masse et de la force musculaire sur 4 mois. Les foyers de nécrose sont quasi-absents et les myocytes présentent des noyaux en position périphérique. La détection en immunofluorescence du δ -sarcoglycan s'accompagne de la restauration des sous-unités α , β et γ -sarcoglycan. Plus tard, Dressman et al s'intéressent aux α et β -sarcoglycanopathies (Dressman et al., 2002), qui sont les deux

sarcoglycanopathies majeures dans la population européenne et américaine (Duggan et al., 1997). Ils utilisent pour cela deux modèles murins transgéniques présentant un KO dans le gène de l' α ou du β -sarcoglycan. Les animaux ayant reçu les vecteurs (5.10^{10} à 2.10^{11} d'AAV2-CMV- β SG) dans les 15 premiers jours de vie présentent une correction jusqu'à plus d'un an et demi après l'injection. Les animaux ayant reçu le vecteur à trois mois présentent toujours toutefois des images de dégénérescence/régénérescence musculaire un mois après l'injection. Les auteurs montrent aussi de façon étonnante que l'expression d' α -sarcoglycan est transitoire. La perte d'expression ne serait pas due à une réponse immunitaire contre la protéine exprimée à partir d'un ADNc humain (test chez des souris *nude*), mais à la toxicité de l' α -sarcoglycan à forte dose.

Plusieurs groupes ont travaillé sur le transfert du gène de la dystrophine. Un modèle de souris transgénique (souris *mdx*) présente une mutation dans la séquence codante de la dystrophine. Comme nous l'avons présenté plus haut, la dystrophine est une protéine de grande taille, codée par un ADN complémentaire de 14 kb. Au vu des capacités d'encapsidation de l'AAV, cet ADNc n'a jamais pu être utilisé tel quel dans ce type de vecteur. Plusieurs groupes ont évalué l'efficacité de séquences codantes réduites sous contrôle du promoteur spécifique MCK chez des souris immunocompétentes (Wang et al., 2000a), (Yuasa et al., 2002) (Watchko et al., 2002) ou CMV chez des souris *nude* (Fabb et al., 2002). Les constructions utilisées codent pour la dystrophine humaine. Wang et al (Wang et al., 2000a) évaluent deux minidystrophines délétées de 75% du domaine central et de la quasi-totalité de la partie C-terminale de la dystrophine native. Les séquences codantes sont inférieures à 4,2 kb. Une des constructions a été reprise plus tard par le même groupe (Watchko et al., 2002). Plus tard, le groupe de G.Dickson (Fabb et al., 2002) utilise une séquence de moins de 3,8 kb codant pour une microdystrophine, sous contrôle du promoteur CMV. La séquence codante est délétée d'une grande partie du domaine de fixation à l'actine. Même s'il est difficile de faire une comparaison entre ces deux études (deux souches différentes de souris et deux promoteurs différents utilisés), il n'en reste pas moins que les mini et micro-dystrophines sont fonctionnelles. Injectées à des souris de 10 à 12 jours (avant l'apparition de la maladie à 3 semaines), les constructions permettent une restauration de la dystrophine et des α , β et γ -sarcoglycan 3 à 5 mois après injection. Comme montré dans les modèles le LGMD chez la souris, l'administration des vecteurs après déclenchement de la

maladie chez des animaux de 50 jours se traduit par un taux de transduction inférieur et une persistance des phénomènes de dégénérescence/régénérescence (Wang et al., 2000a).

Gregorevic et al (Gregorevic et al., 2004) obtiennent une correction phénotypique sur 8 semaines après injection intra veineuse d'AAV6 (10^{13} vg/animal) codant pour la microdystrophine sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique (CK6). L'efficacité du transfert de gène est toutefois conditionnée par la coadministration de VEGF. De plus, l'étude de dissémination imposée par le mode l'injection (injection IV, VEGF) ne montre pas clairement l'absence de transgène dans les gonades.

La nature du promoteur dans des contextes inflammatoires a une influence sur la persistance de l'expression du transgène. Yuasa et al (Yuasa et al., 2002) montrent qu'après injection d'AAV-CMV-LacZ, des souris mdx développent une réponse humorale contre la β -Galactosidase plus forte que des souris C57Bl/10. Des infiltrats inflammatoires typés en CD4, CD8, CD11b/CD11c (macrophages) et CD11c/CD205 (cellules dendritiques) sont observés 4 semaines post-injection, également chez des souris transgéniques exprimant une minidystrophine. L'utilisation du promoteur MCK permet de limiter la réponse immunitaire humorale, même si celle-ci survient apparemment plus tard (réponse humorale à 8 semaines au lieu de 4 semaines post-injection).

Des essais cliniques de phase I concernant des déficits en alpha-antitrypsine (ADNc sous contrôle du promoteur CAG dans un contexte AAV-2) sont en préparation (Flotte et al., 2004).

➤ **Transfert du gène de l'Epo**

L'érythropoïétine (Epo) est une cytokine sécrétée par le rein intervenant dans la régulation de l'érythropoïèse (Erslev, 1991) (Krantz, 1991) (Fisher, 2003). Le poids de la molécule évalué en Western Blot est très variable en fonction de la glycosylation. Le gène humain (5 exons, 4 introns) code pour une protéine de 193 acides aminés (192 pour l'Epo simienne et murine), contenant un peptide signal de 27 acides aminés clivé lors de la sécrétion de la

molécule, donnant un peptide de 166 acides aminés (Lai et al., 1986). Le résidu Arginine à l'extrémité C-terminale n'est pas retrouvé sur l'Epo recombinante et l'Epo humaine urinaire, due probablement à l'action d'une carboxypeptidase intracellulaire (Recny et al., 1987). L'érythropoïétine est une protéine fortement glycosylée, avec des glucides O- et N-liés. La masse moléculaire de la partie protéique est d'environ 19 kDa (Lin et al., 1985), alors que le poids de la molécule entièrement glycosylée est de 30 à 34 kDa selon la méthode utilisée (34 kDa pour l'Epo urinaire déterminé par SDS-PAGE, (Miyake et al., 1977), 30,4 kDa pour l'Epo recombinante humain déterminé par équilibre de sédimentation (Davis et al., 1987)) (Erslev, 1991) (Krantz, 1991) (Fisher, 2003) (Mayeux et al., 1990). Les oligosaccharides peuvent donc représenter jusqu'à 40% du poids de la molécule. L'érythropoïétine favorise la maturation des précurseurs de la lignée rouge (CFU-E et proérythroblastes) par un effet anti-apoptotique en retardant la dégradation de l'ADN dans ces cellules (Koury and Bondurant, 1990).

L'ADNc de l'Epo a été utilisé à de nombreuses reprises comme gène rapporteur après transfert dans le muscle de souris (Kessler et al., 1996) (Clark et al., 1997) (Snyder et al., 1997b) (Vincent-Lacaze et al., 1999) (McCarty et al., 2001) (Bohl et al., 1997) (Bohl et al., 1998), de chat (Beall et al., 2000) ou de primate (Zhou et al., 1998) (Rudich et al., 2000) (Chirmule et al., 2000) (Ye et al., 1999) (Favre et al., 2002). Dans un contexte AAV, la faible taille de l'ADNc (moins de 600 pb, Gene Bank M18189 pour l'Epo simienne) est un avantage. La protéine est de plus facilement dosable dans le serum par ELISA et ses effets biologiques rendent le suivi de son expression aisé (mesure de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine, comptage des réticulocytes).

Dans toutes les études, le transfert de l'ADNc de l'Epo homologue entraîne une polyglobulie persistante à l'origine d'une augmentation de l'hématocrite. Notamment dans une étude à long terme où l'ADNc de l'Epo murine est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CMV) (Snyder et al., 1997b), l'expression du transgène est maintenue pendant 7 mois. Elle est fonction de la quantité de vecteurs injectée et entraîne une augmentation supra-physiologique de l'hématocrite. Les souris ayant reçu $2,7 \cdot 10^{11}$ particules d'AAV présentent un hématocrite proche de 90%, atteint en 6 semaines. Ces valeurs élevées d'hématocrite sont en général bien supportées chez les rongeurs, même s'il faut rester conscient des risques de thrombo-embolie et d'atteinte du bien-être. Il est montré que les animaux développent des phénomènes adaptatifs en réponse à des hématocrites élevés (Vogel Blood 2003).

Les travaux réalisés chez le babouin (Zhou et al., 1998) et le macaque cynomolgus (Rudich et al., 2000) montrent qu'il est possible d'obtenir des taux supraphysiologiques d'Epo sérique allant de 40 à 60 mUI/mL (le taux basal est voisin de 2 mUI/mL, kit ELISA R&D) après injection de 2.10^{11} à 2.10^{12} particules virales. La réponse est fonction de la dose de vecteurs injectée. Les valeurs mesurées augmentent jusqu'à atteindre un plateau 6 à 8 semaines après l'administration de vecteurs. Dans l'expérience faite sur les macaques cynomolgus (Rudich et al., 2000), les taux d'Epo élevés sont maintenus pendant 10 mois. Dans l'étude faite chez les babouins, les taux d'Epo sécrétés chutent 10 semaines après injection, pour revenir à un taux de 10 mUI/mL au bout de 26 semaines. Cette perte d'expression pourrait être expliquée par une réponse immunitaire contre la protéine sécrétée, les auteurs utilisent en effet l'ADNc de macaque fascicularis et non de babouin. Toutefois, les animaux ne développent pas d'anémie et présentent un hématocrite constant (compris entre 60 et 70%) jusqu'à la fin de l'expérience et les auteurs ne mettent pas en évidence d'anticorps dirigés contre l'Epo. Le groupe de Jim Wilson a obtenu une expression sur 6 ans après transfert d'AAV-CMV-Epo chez le babouin (Rivera, non publié).

L'Epo recombinante humaine est utilisée comme protéine thérapeutique dans les cas d'insuffisance rénale (utilisée en transfert de gène dans 3 essais cliniques de phase I, dont un ouvert en Israël par Eitan Galun sur des patients insuffisants rénaux chroniques et anémiques). Elle peut aussi être utilisée dans des cas d'hémoglobinopathies avec dysérythropoïèse majeure (drépanocytose, thalassémies (Olivieri et al., 1998)). L'histoire du transfert de gène de l'Epo a été en partie reliée aux β thalassémies. Même si des travaux récents montrent que l'utilisation de vecteurs rétroviraux permet de transférer l'ADNc de la β -globine dans des cellules souches hématopoïétiques et permet de corriger le phénotype de modèles murins β -thalassémiques et drépanocytaires (Oh et al., 2004), (Imren et al., 2002), (Pawliuk et al., 2001), nous présenterons brièvement les essais thérapeutiques appliqués à la β -thalassémie.

Les thalassémies sont des hémoglobinopathies dues à un déficit de l'expression des gènes α ou β de la globine. Chez l'adulte, les formes d'hémoglobine prédominantes sont constituées de dimères de chaînes α et β (Hb A₁: $\alpha_2\beta_2$) (Galactéros and Beuzard, 1992). Une faible partie de l'hémoglobine circulante est constituée de dimères de chaînes α et δ (Hb A₂ ou variant : $\alpha_2\delta_2$). Avant la naissance, les formes d'hémoglobine circulantes sont majoritairement

constituées de dimères α et γ (Hb fœtale, HbF : $\alpha_2\gamma_2$), ayant une affinité pour l'oxygène supérieure à l'Hb maternelle. En période peri partum, l'expression du gène β remplace majoritairement celle du gène γ (Olivieri, 1999), si bien qu'un an après la naissance l'expression du gène γ est très réduite. Les mécanismes qui contrôlent le passage de l'Hb F à l'Hb A₂ ne sont pas entièrement élucidés.

Les hémoglobinopathies constituent les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Parmi elles, la β thalassémie et la drépanocytose sont des cibles importantes de la thérapie génique, du fait de leur fréquence et de leur gravité (pour revue, Payen et al., 2001b). Elles se manifestent par des anémies sévères. Les malades ne bénéficient que d'un traitement symptomatique, mis à part la greffe de cellules hématopoïétiques, limitées à une minorité de patients ayant un donneur compatible. La β thalassémie est due à un déficit de la production de chaînes β -globine. Du fait de la cinétique de décroissance de l'expression de globine γ , le diagnostic se fera entre 3 et 18 mois selon la gravité de l'atteinte, puisque la synthèse majoritaire des chaînes γ masque le déficit β . Celle-ci est fonction du type de mutation. Près de 200 mutations différentes ont été décrites chez des patients atteints de β thalassémie et de troubles associés. Les thalassémies de types β^0 sont dues à un défaut de synthèse des chaînes β -globine et les thalassémies de type β^+ à une réduction de synthèse (pour revue, (Olivieri, 1999)). Environ la moitié des mutations impliquées gênent la traduction ; ceci inclut des mutations déplaçant le cadre de lecture ou des mutations non sens, amenant une thalassémie de type β^0 par introduction d'un codon stop. Une famille de mutations identifiée récemment aboutit à la production de chaînes instables de β -globine de longueurs variables. De plus, des mutations faux-sens donnent également des chaînes α -globines instables. Dans tous les cas la synthèse des chaînes α n'est pas affectée par le déficit en chaîne β . Les chaînes α libres sont instables et précipitent dans les érythroblastes. Cet excès de chaînes α libres induit des oxydations anormales conduisant à la mort cellulaire et aboutissant à une érythropoïèse inefficace même chez les hétérozygotes. Les érythroblastes rescapés qui sont à l'origine des hématies circulantes sont ceux dont le déficit de synthèse est le moins accentué, en particulier ceux où une synthèse de chaînes γ , et par conséquent de l'HbF, a lieu. Du fait de l'érythrophagocytose, les malades présentent une splénomégalie. En réponse à l'anémie, les patients présentent des taux d'érythropoïétine élevés avec une stimulation de la moelle osseuse érythropoïétique, aboutissant à des déformations osseuses du crâne et de la face, ainsi que des microfractures et des ostéomalacies (Galactéros and Beuzard, 1992). De nombreux

organes sont le lieu d'une surcharge en fer, en particulier le cœur et le foie, siège d'une érythropoïèse extramédullaire en particulier chez les patients hypoperfusés. La forme la plus grave, ou anémie de Cooley, est une anémie particulièrement sévère, spontanément dans la petite enfance en l'absence de transfusions régulières ou même plus tard en raison de la surcharge en fer induite par ces transfusions en l'absence de traitement chélateur de fer (déféroxamine).

L'érythropoïétine a été envisagée comme protéine thérapeutique pour les β thalassémies depuis de nombreuses années. Il est montré qu'elle améliore le phénotype des patients thalassémiques. L'administration de la protéine recombinante, en parallèle ou non avec de l'hydroxyurée (Lavelle et al., 2001) stimule la production de γ -globine chez le babouin (Al-Khatti et al., 1987), et donc d'hémoglobine fœtale. Cette hémoglobine fonctionnelle permettrait alors de corriger le phénotype chez les malades. L'érythropoïétine recombinante est cependant à l'heure actuelle beaucoup trop coûteuse pour être utilisée à des doses pharmacologiques, même dans des essais cliniques prolongés. L'expression in vivo de l'hormone après transfert de l'ADNc est une alternative intéressante. L'injection intramusculaire de l'ADNc de l'Epo murine sous forme d'ADN nu après électrotransfert (Payen et al., 2001), (Samakoglu et al., 2001) ou d'AAV (Bohl et al., 2000) chez des modèles murins de la maladie a donné des résultats encourageants. Les taux d'Epo obtenus permettent une augmentation de l'hématocrite des animaux avec augmentation de la demi-vie des globules rouges (Payen et al., 2001). La synthèse des chaînes β mineure de globine (équivalent murin de la chaîne fœtale γ chez l'homme) est augmentée (Samakoglu et al., 2001) (Bohl et al., 2000) et une diminution des chaînes α seules associées à la membrane des érythrocytes (Payen et al., 2001) un an après transfert de gène dans le cas de l'AAV (Bohl et al., 2000). Toutefois ces essais réalisés avec des promoteurs CMV ou MCK entraînent une polycythémie chez la quasi-totalité des animaux. Dans ce contexte, l'utilisation de systèmes de régulation de l'expression dépendant de la rapamycine (Johnston et al., 2003) ou de la doxycycline (Samakoglu et al., 2002) permet de contrôler l'expression du transgène. Les travaux réalisés par le groupe de Jean-Michel Heard montrent qu'il est possible avec un système inductible à la doxycycline d'adapter le dosage de l'inducteur à l'hématocrite (Samakoglu et al., 2002). Il est alors possible de faire exprimer des taux supraphysiologiques d'Epo en gardant les animaux normocythémiques sur une période longue (9 mois). Dans ce cadre, le taux de chaînes β -mineure de globine exprimés dans les érythrocytes est trois fois

supérieur à celui exprimé chez les animaux non traités et permet une amélioration de la qualité des globules rouges.

g. Modification du tropisme des vecteurs AAV

Plusieurs groupes ont cherché à modifier le tropisme de l'AAV-2. Bartlett et al (Bartlett et al., 1999) ont pu transduire des lignées mégacaryocytaires, non transduites par l'AAV « natif », en insérant dans la capsid du vecteur un anticorps spécifique de ces lignées. Un bras Fab' γ reconnaît l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, exprimée à des niveaux élevés à la surface des cellules DAMI et MO7e, et l'autre reconnaît la capsid de l'AAV. Le pouvoir de transduction du vecteur sur ces cellules dépend de l'inclusion de l'anticorps, puisque l'infection n'est pas inhibée si le vecteur natif est rajouté à fortes doses, contrairement à la transduction des cellules HeLa dont l'infection est largement inhibée par compétition avec l'AAV natif. Ces vecteurs pourraient en théorie trouver des application cliniques lorsqu'il faut transduire un type cellulaire particulier. L'utilisation d'un vecteur pré-incubé avec un anticorps spécifique exprimé à la surface de cellules cancéreuse serait judicieuse de manière à transférer un gène suicide dans ces cellules (Kanazawa et al., 2003). De telles approches seraient beaucoup plus sécurisées que l'administration *in situ* de vecteur natif qui risque de transduire des cellules saines à distance.

Les groupes de Trepel et Kleinschmidt ont utilisé une autre stratégie (Muller et al., 2003). Elle consiste en l'utilisation de séquences mutées de VP3, qui permettent d'exprimer à des endroits extériorisés de VP3 des peptides spécifiques d'une lignée cellulaire cible. Les peptides spécifiques sont présentés sur la capsid près du résidu Arginine 588, site jouant un rôle prédominant dans la reconnaissance par l'héparine. Les auteurs ont constitué une banque de plasmides contenant 7 peptides aléatoires insérés en position 3967 dans la séquence codante de VP3. Après clonage et sélection, les plasmides ont été transfectés dans des cellules 293 pour produire des vecteurs exprimant ces peptides à la surface de la capsid. De manière à sélectionner les clones infectieux, des cellules 293 ont été infectées par ces vecteurs en présence d'adénovirus. Les vecteurs amplifiés ont constitué la librairie de vecteurs mutants. Les cellules endothéliales primaires sont mal transduites par l'AAV-2, les clones ont donc été

sélectionnés après trois phases d'infection sur des cellules endothéliales primaires en présence d'adénovirus. La séquence comprenant la zone d'insertion des peptides a été amplifiée par PCR et séquencée et trois motifs peptidiques majoritaires ont été sélectionnés. Le motif retrouvé le plus fréquemment a été testé chez la souris en comparaison à la capside native de l'AAV-2, après injection intraveineuse de vecteurs codant pour la luciférase. L'expression du transgène était 5 fois plus forte dans le cœur des animaux ayant reçu le clone sélectionné.

D'une manière similaire, Shi et al (Shi and Bartlett, 2003) ont étendu le tropisme de l'AAV par insertion de motifs RGD (Arginine-Glycine-Asparagine) complémentaires de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les peptides ont été insérés soit au niveau de VP1 (un site dans la région unique de VP1 et 3 sites dans la région commune avec VP2) ou de VP3 (3 sites). L'insertion dans la partie C-terminale de VP3 (près des résidus 584 et 588) n'affecte pas le taux de transduction dans des cellules HeLa. L'infection est peu ou pas inhibée en présence d'héparine, alors qu'elle l'est en présence de motif RGD soluble. Ceci signifie que les vecteurs obtenus peuvent à priori se fixer sur des intégrines β_3 et β_5 , à la différence de l'AAV natif qui n'a pas d'affinité pour les intégrines β_3 . Ils transduisent *in vitro* des lignées cellulaires humaines de lymphoblastome (Raji) et d'adénocarcinome (SKOV-3) exprimant peu d'HSPG et, dans le cas des cellules Raji, peu de β_3 . Les cellules SKOV-3 transplantées chez la souris (génération de cancer des ovaires) sont transduites par les vecteurs sélectionnés injectés en intrapéritonéal. Ces travaux montrent qu'il est donc possible d'élargir le tropisme de l'AAV.

Des groupes cherchent aujourd'hui à produire et tester *in vivo* des vecteurs chimères. Le but est d'obtenir des vecteurs dont la capside est composée de VP de deux sérotypes différents. Les vecteurs sont produits par tritransfection de cellules 293 : plasmide helper adénoviral et deux plasmides helper rep-cap de chaque sérotype apportés à des ratios variables. Hauck et al (Hauck et al., 2003) ont produit des vecteurs chimères de sérotypes 1 et 2. Se basant sur le fait que les deux sérotypes présentent 80% d'homologie sur la séquence d'acides aminés, ils prennent le pari que les VP pourront s'assembler et que les capsides formées seront stables. Comparé à l'AAV-2 seul, les rendements de production diminuent par contre d'un log (production identique à l'AAV-1 seul). Les plasmides helper ont été transfectés à des ratios AAV1/AAV2 de 10 : 0, 9 : 1, 1 : 1, 1 : 9, 0 : 10. 0. A partir du ratio 1 : 1 et au-delà, les vecteurs présentent une affinité pour l'héparine, moindre toutefois que

l'AAV2 seul. Ceci signifie que les vecteurs ont incorporé des VP d'AAV-2, en quantité moindre que l'AAV2 natif. De plus, les anticorps neutralisants des deux sérotypes cross réagissent, ce qui va plus fortement dans le sens de l'incorporation de VP des deux sérotypes. Les taux de transduction dans le muscle et le foie sont augmentés. En comparaison à l'AAV1 natif dans le foie, qui donne un taux de transduction 5 à 10 fois inférieur à l'AAV-2, les vecteurs chimères ayant incorporé au moins 50% de VP de sérotype 1 présentent un taux de transduction comparable à l'AAV-2. De manière identique pour le muscle, les vecteurs ayant incorporé au moins 50% de VP d'AAV-1 présentent un taux de transduction comparable à l'AAV-1. Il faut noter que ces vecteurs chimères sont distincts des vecteurs hybrides, comme l'AAV-6 (Xiao et al., 1999) et (Gao et al., 2002). Il faut toutefois remarquer que l'utilisation en clinique de vecteurs chimères pourrait être limitée par la présence d'anticorps neutralisants d'un autre sérotype.

Rabinowitz et al (Rabinowitz et al., 2004)) vont plus loin en produisant des vecteurs chimères de plusieurs sérotypes. Les plasmides helper utilisés sont décrits précédemment ((Rabinowitz et al., 2002) et figure 9 « Production de vecteurs pseudotypés de sérotypes 1 à 5 »). Les plasmides ont été transfectés à des ratios variables (19:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:19). Tous les vecteurs obtenus ont été purifiés sur gradient de chlorure de césium. Comme pour l'étude précédente, l'incorporation de VP d'un autre sérotypes change l'affinité des vecteurs pour certains substrats. Par exemple, l'incorporation de VP de sérotype 2 ou 3 dans des capsides d'AAV-1 permet d'augmenter l'affinité à l'héparine (qui devient même comparable aux vecteurs natifs). Inversement, des quantités croissantes de VP de sérotype 5 dans des capsides de sérotypes 2 ou 3 diminuent considérablement la fixation à l'héparine. L'affinité au substrat n'est pas changée pour les vecteurs chimères de sérotypes 2 et 3, quel que soit le ratio de plasmides helpers transfectés, ce qui montre que les capsides formées sont, du point de vue de l'affinité au substrat, inchangées par rapport aux vecteurs natifs. De même, l'incorporation de VP de sérotype 5 dans des capsides de sérotype 2 et 3 augmente la fixation à la mucine. De manière surprenante, certaines combinaisons présentent un effet « synergique ». C'est le cas des vecteurs chimères 1/2 (pour des ratios 1:3 et 1:19) qui présente un taux de transduction 4 fois plus élevé que l'AAV-2 sur des cellules musculaires de souris. Toutefois ces résultats sont à pondérer selon le taux de transduction de l'AAV-1 sur ces cellules. Ces vecteurs sont actuellement testés *in vivo* (Rabinowitz, non publié).

1.4 Régulation de l'expression d'un transgène

1.4.1 Nécessité de réguler l'expression d'un transgène

Comme nous l'avons exposé plus haut, la sécrétion d'une protéine thérapeutique à long terme permet d'obtenir une correction phénotypique dans certains modèles de maladies génétiques. Dans l'optique d'applications cliniques ultérieures, la sécrétion à partir de tissus cibles génétiquement modifiés, en comparaison à l'injection de protéine recombinante ou extraite de tissus animaux, peut présenter des avantages notables (en terme de coût et de simplicité du traitement). Toutefois, de telles applications supposent que l'on soit capable de contrôler le niveau d'expression du transgène. Par exemple, dans les cas particuliers d'apport d'érythropoïétine dans le traitement de certaines anémies comme la β -thalassémie ou l'apport d'hormone de croissance dans les nanismes, la surexpression du transgène peut entraîner des effets secondaires préjudiciables. Il faut donc être en mesure de réguler finement la quantité de protéine sécrétée, de manière à maintenir cette quantité dans une fenêtre thérapeutique et à assurer une efficacité biologique optimale. Un système de régulation doit aussi permettre d'arrêter à la demande l'expression du transgène, si l'on veut mettre un terme provisoire ou définitif au traitement. La régulation de l'expression d'un transgène est donc un critère d'efficacité et surtout de sécurité.

1.4.2 Utilisation de systèmes de régulation *in vivo*

Différents systèmes de régulation d'un transgène ont été utilisés *in vitro* et *in vivo*. Ils sont tous de nature hétérologue. Au cours de leur développement, et encore à l'heure actuelle, les mêmes questions se posent, de manière à s'approcher des qualités d'un système de régulation idéal :

- expression négligeable en l'absence d'inducteur
- inductibilité élevée, modulable (effet dose d'inducteur – réponse) et réversible

- persistance à long terme de la régulation

Les plus utilisés sont le système Ecdysone, le système Mifépristone (jamais développés chez le gros animal et abandonnés à l'heure actuelle), le système Rapamycine et le système Tétracycline (système développé depuis plusieurs années au laboratoire, cf. infra) (pour revue, voir (Clackson, 2000) (Toniatti et al., 2004). Tous ces systèmes ont en commun l'utilisation d'un inducteur, qui permet soit la formation d'un dimère à partir de deux protéines cellulaires (système rapamycine), soit se fixe sur un transactivateur qui permet l'expression du transgène (systèmes ecdysone, mifépristone et tétracycline). Ces complexes, en se fixant sur des séquences opératrices spécifiques clonées en amont d'un promoteur eucaryote permettent d'activer l'expression du transgène.

Les systèmes ecdysone (No et al., 1996) et mifépristone (Wang et al., 1994) (Serguera et al., 1999) utilisent un transactivateur constitué du domaine de liaison à l'ADN de l'activateur transcriptionnel Gal-4 fusionné d'une part au domaine de fixation de l'hormone stéroïde utilisée (ecdysone) ou au RU486 (anti-progestérone = mifépristone) et d'autre part au domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex.

Le système rapamycine (Rivera et al., 1996) utilise le contrôle de la dimérisation de deux protéines chimériques. L'une est constituée du domaine de liaison à la rapamycine de la protéine cellulaire humaine FRAP associée au domaine de transactivation p65 du facteur nucléaire NFκB. L'autre est une fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine non eucaryote ZFHD-1 et de trois domaines de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FKBP12. En présence de rapamycine, ces deux protéines se lient pour former un complexe d'activation de la transcription.

Cependant, la nature des inducteurs propres à ces systèmes et leurs effets secondaires possibles (hormone stéroïde, anti-progestérone, immunosuppresseur) ont limité, au début en tout cas, l'utilisation de la majorité de ces systèmes. Il faut toutefois noter que la synthèse de dérivés non immunosuppresseurs de la rapamycine a été rapportée. Ils sont actuellement testés en transfert de gène (Rivera et al, non publié).

Les systèmes Rapamycine et Mifépristone ont été utilisés *in vivo* comme systèmes de régulation de la sécrétion d'Epo.

Le système Mifépristone a été évalué chez la souris, après implantation dans la cavité péritonéale de cellules encapsulées infectées in vitro par un rétrovirus (Serguera et al., 1999). Cette étude a été faite en comparaison avec le système tétracycline. Le système mifépristone se caractérise dans ce contexte par une cinétique d'induction et de désinduction plus lente que le système tétracycline.

L'efficacité du système Rapamycine a été évaluée chez la souris immunocompétente (Rivera et al., 1999) ou non (Magari et al., 1997), le rat (Auricchio et al., 2002) et le primate ((Ye et al., 1999), Rivera travaux en cours). Les travaux réalisés chez la souris montrent une persistance de la régulation, avec un niveau d'induction faible toutefois (taux d'Epo en induction de 60 mUI/mL, à comparer au niveau basal de 30 mUI/mL) et inconstant selon la dose de rapamycine administrée. Le système a aussi été testé sur des macaques rhesus. Si les données publiées ne permettent pas de juger objectivement des éventuelles fuites, il nous permet toutefois d'explorer les cinétiques d'induction et de désinduction. Pour des niveaux d'induction similaires, ces cinétiques paraissent plus lentes que celles obtenues avec le système Tet au laboratoire (Favre et al., 2002) (cf. infra). Ceci serait dû à la demi-vie longue de la rapamycine comparée à la doxycycline. Le système ne montre pas de persistance au-delà de 80 jours.

Le système Tet a été plus largement utilisé. Il fait intervenir comme inducteur la doxycycline, antibiotique analogue de la tétracycline, dont l'innocuité aux doses utilisées ne fait aucun doute (doses identiques aux doses thérapeutiques). Les origines du système remontent à une dizaine d'années, quand Gossen et Bujard avaient développé un système dérivé de l'opéron de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli* (Gossen and Bujard, 1992). La résistance à l'antibiotique est assurée par une protéine membranaire qui élimine la drogue hors de la bactérie. L'expression de cette protéine est induite par la tétracycline. Le mécanisme mis en jeu fait intervenir une protéine répresseur de la transcription (TetR) normalement fixée sur l'opérateur Tet-O et qui est déplacée en présence de l'antibiotique. Une protéine transactivatrice artificielle (tTA pour “*tetracycline controlled Trans-Activator*”) a été construite en fusionnant le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex avec le domaine de liaison à Tet-O de la protéine TetR. La séquence Tet-O a été placée en amont d'un promoteur minimal dérivé du Cytomégalo virus (promoteur CMVmin) pour former le promoteur P_{tet}-1. En l'absence de tétracycline, la protéine tTA se fixe sur la séquence Tet-O avec une très grande affinité et une

grande spécificité, induisant l'initiation de la transcription. En présence de tétracycline, ou de ses dérivés comme l'anhydrotétracycline (Gossen and Bujard, 1993) ou la doxycycline (Dox), le tTA se lie préférentiellement à l'antibiotique, ce qui, à la faveur de changements conformationnels, entraîne une baisse de l'affinité de tTA pour les séquences Tet-O et un arrêt de la transcription. Ce système suppressible par la Dox a été baptisé Tet-Off (Rendahl et al., 1998) (Folliot et al., 2003) (Mizuguchi and Hayakawa, 2002).

A l'inverse, un système inductible par la Dox (système Tet-On) a été développé quelques années plus tard. En opérant une mutagenèse chimique sur le domaine Tet-R, le groupe d'H. Bujard (Gossen et al., 1995) obtient une version rTet-R qui présente des caractéristiques opposées au Tet-R : sans affinité pour les séquences Tet-O en l'absence de Dox, elle s'y fixe avec une forte affinité en présence d'inducteur. Fusionnée au même domaine VP-16, elle a été baptisée rtTA (*reverse tetracycline-controlled Trans-Activator*). L'utilisation de souris transgéniques exprimant de façon constitutive tTA et rtTA a montré qu'il était possible d'avoir une induction et une désinduction rapide (9 à 24 heures) dans tous les tissus (Kistner et al., 1996).

Le système Tet-On dirigeant l'expression de l'Epo murine (Epom) a été utilisé dans le muscle de souris avec des vecteurs rétroviraux (Bohl et al., 1997) ou AAV (Bohl et al., 1998). L'étude de D.Bohl présentait une construction unique contenant les deux cassettes d'expression du trans-activateur et du transgène. Pourtant, des travaux précédents et récents se sont basés sur des stratégies à deux vecteurs, où chaque cassette d'expression est véhiculée par un vecteur distinct. Cette stratégie, même si elle résout des problèmes de clonage, présente toutefois des inconvénients, en terme de rendement de transduction (la reconstitution du système de régulation nécessite deux événements de transductions aléatoires) et d'efficacité. En effet, à la faveur des recombinaisons entre vecteurs (événements surtout montrés dans le foie, certes), le système pourrait subir quelques modifications.

La construction utilisée par D.Bohl (Bohl et al., 1998) chez la souris C3H comportait les deux cassettes d'expression du trans-activateur et du transgène en sens inverse (voir Figure 14 page suivante : "Système Tet-On"), séparées par un signal de polyadénylation bidirectionnel (pA SV40).

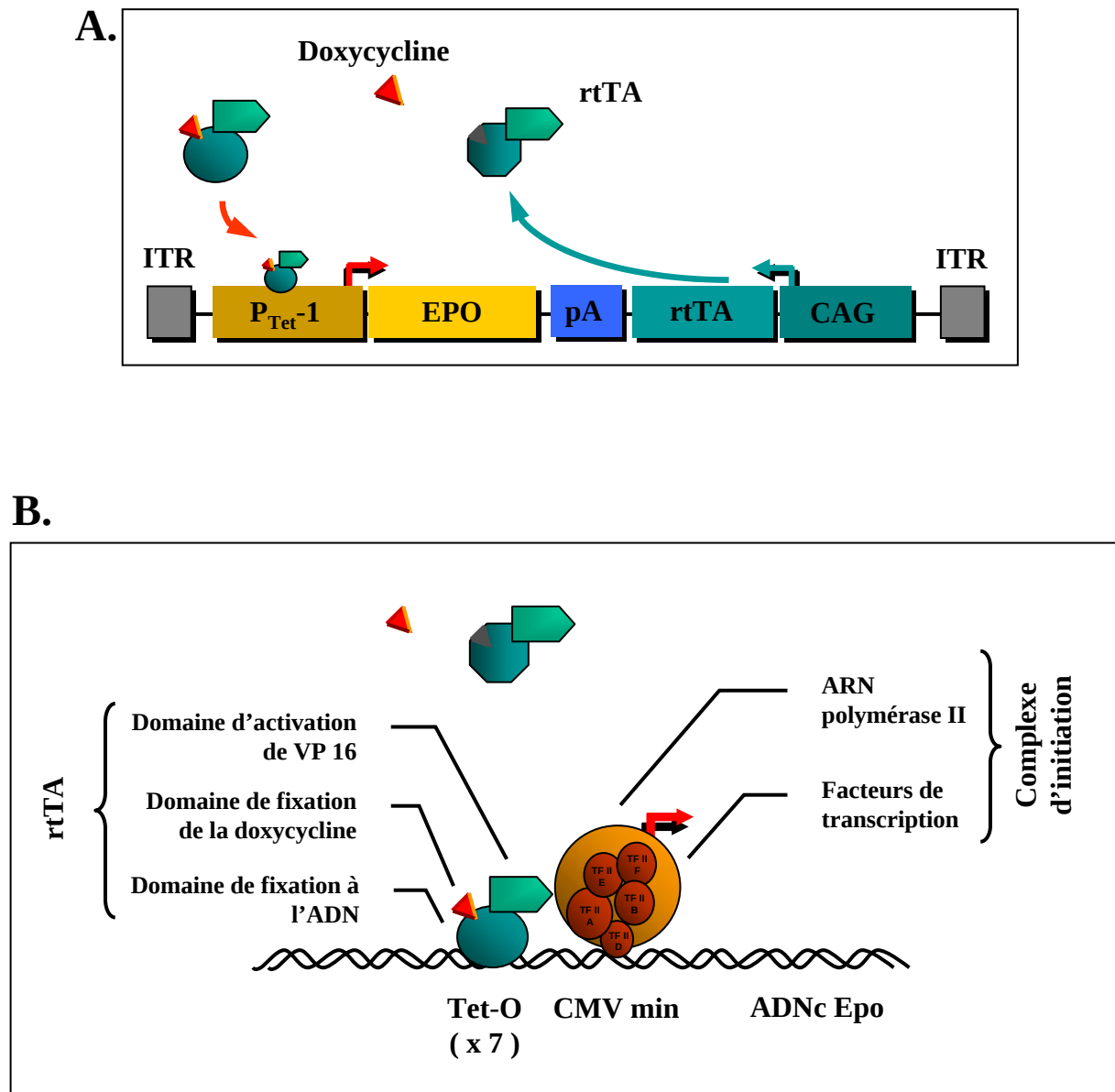


Figure 14 : Système Tet-On

(A) **Construction utilisée par Favre et al., 2002.** Le vecteur présente deux cassettes séparées par un pA bidirectionnel codant respectivement pour le rtTA sous contrôle du promoteur CAG et l'érythropoïétine de macaque fascicularis sous contrôle du promoteur inducible P_{Tet-1} . En présence de doxycycline, le rtTA interagit avec le P_{Tet-1} et active la transcription. (B) **Modèle d'activation de la transcription par un système Tet-On** Le schéma représente l'extrémité 5' de la cassette d'expression du transgène, constituée de 7 répétitions des séquences opératrices Tet-O fusionnées à un promoteur CMV minimal cloné en amont de l'ADNc de l'Epo. La fixation du rtTA sur les séquences activatrices permet le recrutement des facteurs de transcription puis de l'ARN polymérase II pour former le complexe d'initiation et activer la transcription.

Dans l'étude de D.Bohl, après injection des AAVr dans le muscle tibial crânial, l'ajout de Dox dans l'eau de boisson d'une partie des animaux s'est soldée par une augmentation de l'hématocrite qui redescend ensuite au retrait de l'inducteur. La décroissance respecte à peu près la demi-vie des érythrocytes (24 jours). La réinduction ou l'induction 5 semaines après l'injection est possible. Les taux d'Epo sérique mesurés en présence de Dox montrent que le potentiel d'induction est maintenu sur la durée de l'étude (29 semaines). Les niveaux d'induction obtenus sont élevés (taux d'Epo en induction de 500 à 1000 mUI/mL, à comparer au taux de base de 30 mUI/mL). Les travaux montrent qu'il est possible d'obtenir une sécrétion inductible et réversible contrôlée par la doxycycline par un système Tet-on chez la souris. L'expérience, poursuivie sur plus d'un an et demi, a montré une persistance de la régulation.

Toutefois, les animaux ne recevant pas de Dox ont présenté une augmentation de l'hématocrite, signant une expression du transgène en l'absence d'inducteur. Cette fuite du système peut s'expliquer par la fixation non spécifique du trans-activateur sur les séquences Tet-O en l'absence d'inducteur, aboutissant à un recrutement de facteurs de transcription au niveau du promoteur CMV minimal (CMVmin) et une activation de la transcription. L'influence de l'ITR 5' comme origine de transcription n'est pas non plus à exclure.

Cependant, le Laboratoire de Thérapie Génique (Inserm U649, CHU Nantes), motivé par la persistance de la régulation chez la souris, a décidé d'évaluer le comportement du vecteur et du système de régulation dans un modèle pré-clinique (Favre et al., 2002). A ce titre, le primate, notamment le macaque fascicularis, a été choisi. Huit animaux ont reçu une injection intramusculaire unique d'AAVr (l'Epo homologue de macaque fascicularis –Epo cm-remplaçant l'Epo murine) et ont été induits régulièrement (injections intraveineuses de Dox 5 jours consécutivement, tous les mois). Chez tous les animaux, la première induction s'est soldée par un pic d'Epo, associé à une réticulocytose et une augmentation de l'hématocrite. Mais chez 7 animaux sur 8, la poursuite des inductions s'est accompagnée d'une diminution progressive de la réponse (plus de réponse dès la troisième ou quatrième induction). L'analyse de l'apparition d'anticorps dirigés contre les deux transcrits véhiculés par le vecteur (Epo cm et rtTA) a mis en évidence une réponse humorale dirigée contre le rtTA. Aucun anticorps anti-Epo n'a été détecté. Des tests ELISPOT IFN- γ utilisant des lymphocytes prélevés dans les ganglions inguinaux drainant les muscles injectés, stimulés par des cellules dendritiques autologues exprimant la partie Tet-R, puis mis en présence de lymphocytes B immortalisés

par le virus Herpes papio exprimant ce même épitope ont mis en évidence une réaction spécifique des lymphocytes T face à l'antigène Tet-R. Cette réponse était de plus corrélée à des infiltrats inflammatoires lymphocytaires (CD4 et CD8) et macrophagiques (CD 68) et une réduction du nombre de copies du vecteur dans le muscle injecté, on pouvait conclure à l'induction d'une réponse cellulaire cytotoxique dirigée contre les fibres transduites. Les tests in vitro de cytotoxicité n'ont pourtant pas réussi à confirmer ces résultats (D.Favre, non publié). Dans l'hypothèse (controversée) de la transduction de cellules présentatrices d'antigènes (et notamment de cellules dendritiques) par le vecteur, cette étude suggérait de tester l'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle.

De plus, le suivi régulier de l'hématocrite et de la concentration sérique d'Epo a montré, comme dans l'étude de D.Bohl, une expression du transgène en l'absence d'inducteur. Il s'agissait toutefois d'une fuite modérée.

2. Résultats

2.1 Objectifs : efficacité de la régulation avec un système tétracycline

Les problèmes soulevés par les travaux de D.Bohl (Bohl et al., 1998) et D.Favre (Favre et al., 2002) (expression du transgène en l'absence d'inducteur et perte de la régulation chez le primate) ont été le point de départ de notre étude. L'objectif premier de notre thèse fut de répondre à deux questions :

- Comment améliorer le niveau de régulation, c'est-à-dire comment réduire le niveau de fuites en l'absence d'inducteur et augmenter le niveau d'induction sans augmenter le niveau de fuites ?
- Est-il possible d'avoir une persistance de la régulation à long terme chez le primate ?

La réponse à ces questions passe par des modifications des cassettes d'expression du trans-activateur et du transgène.

Nous avons testé différentes orientations des cassettes d'expression du transactivateur et du transgène. Ces modifications paraissaient nécessaires, suite à des observations faites auparavant. Des études précédentes montrent en effet que l'orientation des cassettes d'expression a une influence sur l'efficacité de la régulation et notamment l'expression du transgène en l'absence d'inducteur, vraisemblablement due à des interactions entre le promoteur dirigeant l'expression du rtTA et le promoteur inductible P_{tet-1} dans des contextes adénoviraux et plasmidiques (Lamartina et al., 2002) (Salucci et al., 2002). L'effet de l'orientation des cassettes d'expression dans un vecteur AAV n'a jamais été étudiée. De plus les travaux de Delphine Bohl (Bohl et al., 1998) et David Favre (Favre et al., 2002) suggèrent que l'expression basale du transgène est due à une interaction entre l'ITR et le promoteur CMV minimal. On sait en effet que les ITR de l'AAV-2 ont une activité promotrice (Flotte et al., 1993b) (Haberman et al., 2000), il fallait tester une construction où le P_{tet-1} est distant des ITR. Il est d'ailleurs montré que l'action promotrice des ITR est diminuée lorsque la cassette d'expression en est séparée par une séquence isolatrice (Fitzsimons et al., 2001). Nous avons donc comparé trois constructions (voir fig.1 du premier article), distinctes uniquement par l'orientation relative des cassettes : i) une baptisée « *Reverse* » où les promoteurs CAG et

P_{tet}-1 sont éloignés des ITR et fusionnés en leur extrémité 5', ii) une où les cassettes sont clonées dans le même sens, baptisée « *Forward* » et iii) une proche de la construction utilisée précédemment (Bohl et al., 1998) (Favre et al., 2002), baptisée « *Opposite* » où les cassettes sont clonées en leur extrémité 3' et séparées par un polyA bidirectionnel. Notre objectif a été de choisir la construction optimale qui donne *in vivo* un niveau de fuite négligeable et un fort niveau d'induction.

Nous avons dans un second temps évalué l'influence de versions modifiées synthétiques du transactivateur, caractérisées notamment *in vitro* par une activité transcriptionnelle quasi-nulle en l'absence d'inducteur (Urlinger et al., 2000), baptisées rtTA2^s-M2 et rtTA2^s-S2. Des mutations dans le domaine bactérien rTetR leur confèrent une affinité moindre pour les séquences TetO en l'absence d'inducteur (Urlinger et al., 2000). La version rtTA2^s-M2 a de plus une affinité accrue pour la doxycycline, donnant une activité transcriptionnelle maximale *in vitro* pour des concentrations de doxycycline 10 fois moindre en comparaison à la première version du transactivateur (Urlinger et al., 2000) (Kamper et al., 2002). Signalons aussi que le domaine d'activation de la transcription cloné dans les premières versions (130 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine VP16 d'HSV (Gossen and Bujard, 1992)) a été remplacé par trois répétitions d'un domaine minimal de VP16 de 12 acides aminés, baptisé « F » (Baron et al., 1997). Cette modification permet d'obtenir des protéines moins toxiques -elles sont mieux tolérées dans des cellules HeLa (Urlinger et al., 2000)- et devait *a priori* rendre les transactivateurs moins immunogènes. La séquence codante a de plus été modifiée afin d'augmenter l'expression dans des cellules eucaryotes (élimination des sites donneurs et accepteurs d'épissage identifiés, de motifs probables de reconnaissance par des endonucléases et des séquences pouvant conduire à la formation de structures secondaires de l'ARNm) (Urlinger et al., 2000).

Nous avons testé une troisième version du transactivateur, baptisée rtTA2^s-M2nls (Hermann Bujard, non publié), fusion de rtTA2^s-M2 et du signal de localisation nucléaire de l'antigène T de SV40 (séquence de 27 nucléotides clonée en 3' de l'ADNc du domaine rTetR de M2) (Smith-Arica et al., 2000) (Smith-Arica et al., 2001) (Yoshida et al., 1997).

Afin de juger facilement du niveau de fuite, nous avons placé l'expression du rtTA sous contrôle du promoteur fort CAG (Niwa et al., 1991), fusion du promoteur de la β -actine de poulet et de l'enhancer du promoteur précoce du CMV. Le CAG est décrit comme donnant un

fort niveau d'expression dans les cellules CHO (Niwa et al., 1991) et un niveau supérieur au promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) *in vivo* (Xu et al., 2001) (cette étude concerne cependant uniquement le foie). Le promoteur CAG est également très actif dans le muscle après électrotransfert d'ADN plasmidique (E.Zeira ; E.Galun, non publié). Nous avons de plus cloné en 3' de l'ADNc de l'érythropoïétine une séquence WPRE (*Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element*) qui permet d'augmenter l'expression du transgène (Donello et al., 1998). Cette séquence, transcrite à la suite du transgène, agit *in cis* par stabilisation des ARNm de l'Epo. Elle permet de doubler la demi-vie des ARNm (Zufferey et al., 1999) et d'augmenter l'expression du transgène *in vitro* d'un facteur 5 à 8 dans des vecteurs AAV (Loeb et al., 1999) et rétroviraux (Zufferey et al., 1999).

Ces deux étapes de criblage successives (influence de l'orientation des cassettes puis de la version du transactivateur) ont été réalisées chez la souris. La construction optimale a été utilisée chez le primate, l'expression du trans-activateur étant placée sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique (Li and Paulin, 1991) (voir partie « Discussion du premier article, persistance de la régulation »). Ce changement de promoteur nous était suggéré par les résultats de David Favre (Favre et al., 2002) (cf supra). Nous basant sur les études précédentes montrant l'efficacité du transfert de gène dans le muscle médié par l'AAV-1 (Xiao et al., 1999) (Chao et al., 2000) (Chao et al., 2001) (Gao et al., 2002) (Arruda et al., 2004) (Gao et al., 2004b), nous avons jugé qu'il était judicieux d'utiliser ce sérotype pour augmenter l'expression du transgène et rendre plus manifeste toute fuite du système en l'absence d'inducteur.

Premier article

Optimal Design of a Single Recombinant Adeno-associated Virus Derived from Serotypes 1 and 2 to Achieve More Tightly Regulated Transgene Expression from Nonhuman Primate Muscle

Pierre Chenuaud, Thibaut Larcher, Joseph E. Rabinowitz, Nathalie Provost, Béatrice Joussemet, Hermann Bujard, Richard J.S. Samulski, David Favre, and Philippe Moullier. 2004. *Molecular Therapy*. 9(3): 410-418.

Optimal Design of a Single Recombinant Adeno-associated Virus Derived from Serotypes 1 and 2 to Achieve More Tightly Regulated Transgene Expression from Nonhuman Primate Muscle

Pierre Chenuaud,¹ Thibaut Larcher,¹ Joseph E. Rabinowitz,²
Nathalie Provost,¹ Béatrice Joussemet,³ Hermann Bujard,⁴
Richard J. S. Samulski,² David Favre,* and Philippe Moullier[†]

¹INSERM ERM 01-05, CHU Hôtel-Dieu, 44035 Nantes, France

²UNC Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA

³UMR INRA 707, Ecole Nationale Vétérinaire, 44307 Nantes, France

⁴ZMBH, Universitaet Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany

*Present address: Institutes of Virology and Immunology, The J. David Gladstone Institutes, San Francisco, CA 94103, USA.

[†]To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (33) 2 40 08 74 91. E-mail: moullier@sante.univ-nantes.fr.

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector supports long-term transgene expression from skeletal muscle in most mammals, including human. In some instances, the requirement for tight control of the transgene expression is expected. The original tetracycline-dependent system using the rtTA (Dox-on) transactivator displayed a baseline activity in the *off* state but improved versions are now available and need to be evaluated in a single-rAAV-vector strategy. In the present study we cloned, in three different orientations, the two expression cassettes responsible for doxycycline-mediated transgene regulation and further evaluated the basal and inducible activity of the recently described rtTA2^S-S2, rtTA2^S-M2, and rtTA2^S-M2nls transactivators. Evaluations were conducted *in vivo* in mice and nonhuman primates using the respective homologous erythropoietin cDNA as a reporter gene because of its sensitive detection by ELISA. The woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element sequence was also introduced to enhance further the stringency with respect to basal activity in the absence of inducer.

INTRODUCTION

Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is a human parvovirus that has gained increasing interest because of its use as a successful gene transfer vector [1,2]. The viral genome consists of a 4.7-kb single-stranded DNA molecule, which is composed of two 145-base inverted terminal repeats (ITRs) flanking two open reading frames, Rep and Cap. Recombinant AAV (rAAV) vectors used for gene therapy are derived from the wild-type virus by deleting the Rep and Cap open reading frames and replacing them with the transgene and the transcriptional control elements. The only viral sequences retained in the vector are the ITRs.

Long-term expression of transgenes is supported by rAAV vector in a variety of target organs in mammals, including human patients ([3]; for review see [2,4]). Therefore, the tight control of the transgene expression

can be now explored. This is required in some situations, notably when the recombinant protein has a specific therapeutic window, so as to avoid transgene toxicity. A rather limited number of clinically translatable regulatory systems are available, although each of them requires significant improvements. They all have in common the use of chimeric transactivators, the activity of which is controlled by drugs, including tetracycline [5], mifepristone [6], ecdysone [7], or rapamycin [8]. An optimal regulatable system should have no basal activity in the absence of the drug (*off* state), result in high expression levels in the presence of low concentrations of the drug (*on* state), and remain unaffected by the proximity of the AAV ITRs and/or other internal promoters. The latter situation is encountered when the rAAV vector express both the chimeric transactivator and the transgene simultaneously [9,10].

The repressor of the Tn10 tetracycline-resistance operon of *Escherichia coli* (tetR) recognizes its operator (*tetO*) with high specificity [11]. The interaction between repressor and operator is efficiently prevented by tetracycline, particularly by doxycycline (Dox), which binds to tetR with high affinity. A tetR mutant exhibits a reverse phenotype requiring Dox for binding to the *tetO* operator [12]. By fusing the latter with the C-terminal portion of VP16 of herpes simplex virus, the resulting transactivator, rtTA, which efficiently transactivates P_{tet-1} , a minimal promoter fused downstream of an array of *tetO* sequences (*tetO.CMV*), was obtained [5]. The presence of Dox activates transcription. Recently, novel versions of rtTA, called rtTA^S-S2 and rtTA^S-M2, displaying considerably lower activity in the absence of Dox and better inducibility *in vitro* in human cells were generated [13].

Another component that influences the efficacy of regulated transgene expression is the vector design. The presence of two promoters in the same vector, the P_{tet-1} and another promoter driving the expression of the Dox-sensitive transactivator, raises the possibility of detrimental interference between the two expression units. Furthermore, because AAV ITRs were associated with promoter activity [14,15], they should raise the same concern and therefore be taken into consideration when achieving tight regulation.

In the present study we cloned, in three different orientations, the two expression cassettes responsible for Dox-mediated transgene regulation and evaluated the basal and inducible activity of the rtTA^S-S2, rtTA^S-M2, and rtTA^S-M2^{nls} transactivators. Evaluations were done *in vivo* in mice and nonhuman primates using the homologous erythropoietin (Epo) cDNA as reporter gene because of its sensitive detection by ELISA and rapid physiological response as seen in the hematocrit of both animal models. The woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE), which increases transgene expression from an AAV vector [16], was also introduced to enhance strin-

gency further with respect to basal Epo expression in the absence of Dox.

RESULTS

Optimal Orientation of the Transgene and the Transactivator-Expressing Cassettes When Cloned in a Single rAAV

We cloned both expression cassettes encoding the transactivator and the transgene in a single rAAV-2 backbone. When such strategy is followed instead of two vectors, each encoding one of the two components, there are three possible orientations as indicated Fig. 1. The “Forward” orientation is obtained when both independent units have their respective promoter in the same orientation (i.e., 5′ → 3′). The “Reverse” construct has both promoters positioned in the outward orientation, and the “Opposite” construct has both promoters positioned in the inward orientation using a bidirectional polyadenylation (pA) signal. We used the same rtTA^S-M2 transactivator in all three constructs. We produced the corresponding rAAV-2 vector stocks and injected 2×10^8 infectious particles (ip) per anterior tibialis muscle of 10 mice for each orientation tested (total of 30 mice) against 5 mock-injected animals. Hematocrits were obtained weekly and are reported in Fig. 2. We determined Epo concentrations in Dox-induced and non-induced animals at the time of sacrifice (8 weeks post-rAAV injection in the Reverse group and 10 weeks in the Forward and Opposite groups) and they are indicated in Fig. 2 as well. During the 4-week period following the rAAV administration and preceding Dox induction, average hematocrits in the Forward and Opposite groups remained unchanged and were not different from those of the control group (48.9 ± 3.0 and $49.7 \pm 4.7\%$, respectively, vs $47.0 \pm 2.7\%$; $P > 0.3$), whereas the hematocrits in the Reverse mice increased up to 78% on average at week 4 postinjection despite the absence of Dox. After this period, we induced half of the animals in each group by adding Dox to the drinking water; the

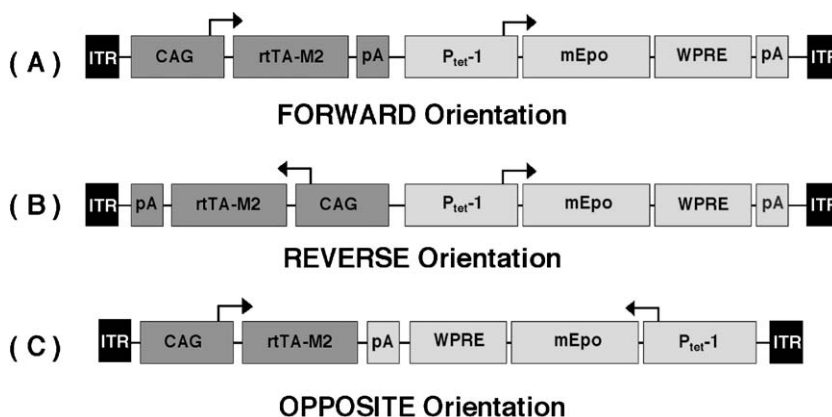


FIG. 1. Structure of rAAV vector plasmids. Vectors encode the murine (or cynomolgus as indicated in the text) erythropoietin cDNA (mEpo) under the control of the doxycycline-inducible P_{tet-1} promoter and the rtTA chimeric protein (different versions, see Materials and Methods) under the control of the CAG promoter [19]. pA (rtTA-M2), bovine growth hormone polyadenylation signal; pA (mEpo), SV40 polyadenylation signal; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; ITR, inverted terminal repeat. Arrows indicate the start transcription site.

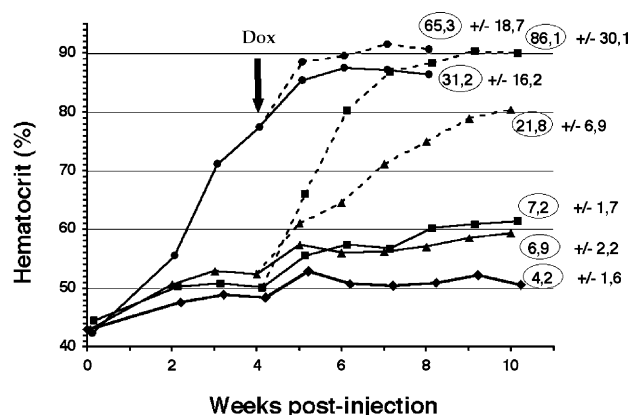
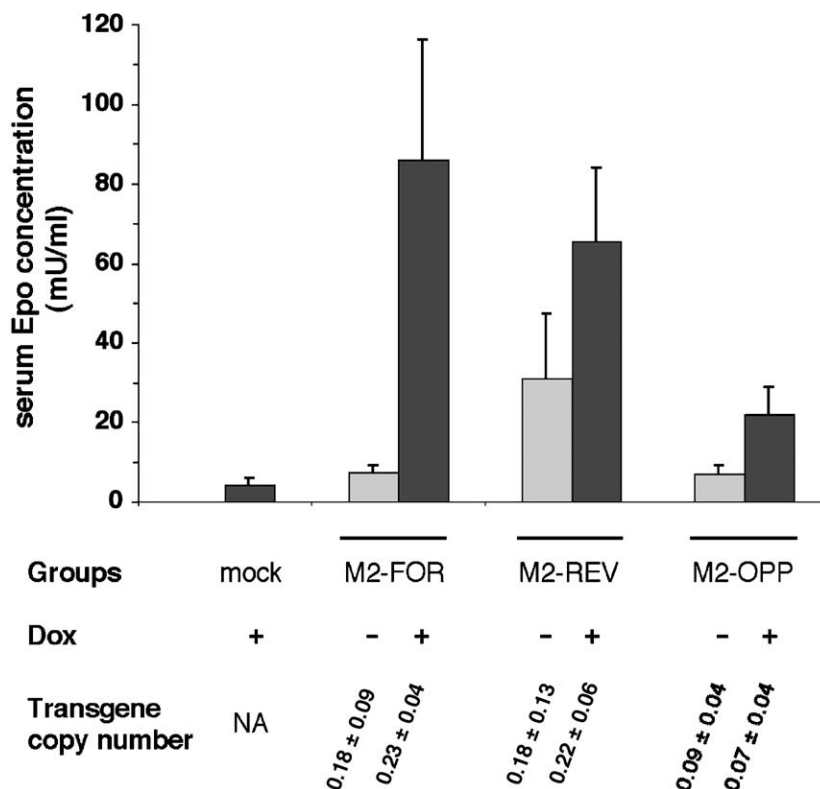


FIG. 2. Comparative performances in mice of the Forward, Reverse, and Opposite vector constructs during a 10-week follow-up. Recombinant AAV-2 vector (2×10^8 ip total) was injected in the anterior tibialis muscle. Hematocrits were determined weekly. Circled numbers correspond to mean recombinant serum Epo levels in mU/ml at the time of sacrifice. Dotted lines, Dox-induced mice ($n = 2$ to 5); solid lines, uninduced mice ($n = 5$). (◆) Control mock-infected animals; (■) Forward construct vector; (▲) Opposite construct vector; (●) Reverse construct vector. Arrow at week 4 indicates that half of the animals ($n = 5$) in each experimental group received Dox in the drinking water.

remaining half received water alone (*off* state). While the hematocrits of the Forward and Opposite groups remained low in the absence of Dox, there was a slight increase in the hematocrit, and at the time of sacrifice the

difference with the control group was significant (mean at week 10, 61.4 and 59.4%, respectively, vs 50.6% (Figs. 2 and 3). In accord with this finding, Epo levels were slightly increased, with 7.2 ± 1.7 and 6.9 ± 2.2 mU/ml found, respectively, in the Forward and Opposite groups vs 4.2 ± 1.6 mU/ml in the mock-injected animals. Notably, these results demonstrated the sensitivity of the Epo system, since a 1.7-fold increase in Epo secretion resulted in a significant increase in hematocrit. In the Dox-induced groups, the Forward construct appeared statistically superior ($P < 0.05$) to the Opposite construct, secreting up to 86.1 ± 30.1 mU/ml Epo (12 times the *off* state) vs 21.8 ± 6.9 mU/ml (3.1 times the *off* state), respectively (Figs. 2 and 3). However, as indicated Fig. 3, vector copy number determined by quantitative PCR in the transduced muscles was 3 times less in the Opposite vs the Forward group (0.07 ± 0.04 vs 0.23 ± 0.04 , respectively), which could explain the difference seen in the *on* state. We also noticed the near-complete loss of regulated secretion of Epo in the Reverse group of mice since the Dox-induced and noninduced groups had virtually the same hematocrit at the time of sacrifice and a nonsignificant difference in serum Epo concentration (65.3 ± 18.7 vs 31.2 ± 16.2 mU/ml, respectively; $P > 0.05$) (Figs. 2 and 3). Altogether, these data indicated that when both promoters driving the expression of the transgene and the rtTA2^S-M2 Dox-sensitive transactivator are positioned apart from each other, but oriented in the same direction

FIG. 3. Comparative performances in mice of the Forward, Reverse, and Opposite vector constructs at the time of sacrifice. The same groups as in Fig. 2 are presented. The Forward and Opposite mice were sacrificed 10 weeks post-AAV injection, whereas the Reverse group was sacrificed at 8 weeks. The performance of each group was determined based on serum Epo levels obtained from Dox-induced (+) and uninduced (−) animals. NA, not applicable. Transgene copy numbers are indicated and were obtained from two to five mice per group.



(i.e., the Forward construct), inducibility is optimal and background activity in the absence of the inducer remains minimal. In contrast, regulation becomes uncontrolled when the two promoters are cloned next to each other and oriented outwardly (i.e., the Reverse construct).

Optimal Version of rtTA2 Transactivator When Cloned along with the Transgene in a Single rAAV

In the selected Forward orientation construct, we then cloned three different transactivators, two of which were described recently [13], the rtTA2^S-M2 (used above) and rtTA2^S-S2, and the remaining rtTA2^S-M2nls, which corresponds to the rtTA2^S-M2 fused to the 27-nucleotide SV40 large T nuclear localization signal cloned 3' of the Tet-R cDNA (H.B., unpublished). Compared to the original rtTA [5], the new versions display considerably lower activity in the absence of Dox and better inducibility *in vitro* in human cells [13]. We produced the corresponding rAAV-2 vector stocks and injected 6×10^7 ip (corresponding to 3.3 times fewer ip than the previous series) into the anterior tibialis muscle of 10 mice for each rtTA transactivator tested (total of 30 mice), with an additional 5 being mock injected. Fig. 4 shows the results obtained after a 73-week follow-up. Fig. 4a focuses on the respective performance with respect to background activity of the rtTA2^S-M2, rtTA2^S-S2, and rtTA2^S-M2nls transactivators in the *off* state (–Dox). Half of the animals in each group were induced 4 weeks post-rAAV-2 administration, whereas the other half was uninduced until week 11, when animals received Dox to confirm vector persistence. This extended period of time allowed a careful evaluation of how tightly controlled the hematocrit was in the context of a rAAV vector. During the first 4 weeks, the average hematocrits in the three experimental groups remained identical to those of the mock-injected animals. However, hematocrits obtained from week 5 to 11 showed that, in the absence of Dox, the three transactivators were unable to maintain hematocrits strictly identical to those of the mock-injected animals. This observation was more pronounced with the rtTA2^S-S2 and rtTA2^S-M2nls versions, which resulted in mean hematocrits of 49.1 ± 0.9 and $51.3 \pm 0.8\%$, respectively, vs $47.1 \pm 1.2\%$ found in the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively). The best candidate in this experimental setting was the rtTA2^S-M2 transactivator, causing a basal activity hardly distinguishable from that of control animals ($48.7 \pm 1.1\%$ vs $47.1 \pm 1.2\%$, $P < 0.03$).

Fig. 4b shows the maximum Epo concentrations detected in the sera upon three successive Dox-induction cycles conducted at weeks 17 (23 for the rtTA2^S-S2 group), 40, and 73. Between each induction, we removed Dox and allowed the hematocrits to return to baseline. Of note, hematocrits obtained with each transactivator immediately before the second and third induction cycles were identical to the initial hematocrits described in Fig.

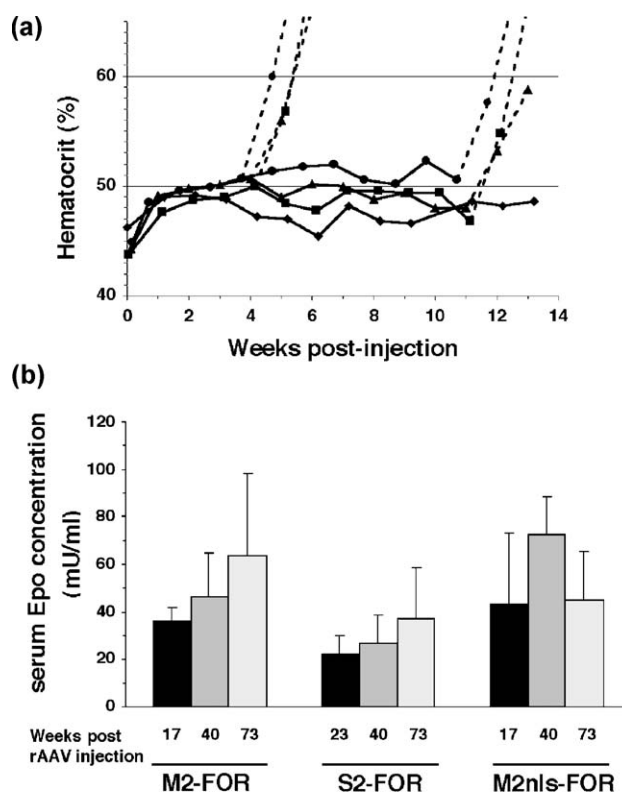


FIG. 4. Comparative performances in mice of the three rtTA transactivators. Recombinant AAV-2 vector (6×10^7 ip total) was injected in the anterior tibialis muscle. (a) 13-week follow-up vs hematocrit readout. (♦) Control mock-infected animals; (■) rtTA2^S-M2; (▲) rtTA2^S-S2; and (●) rtTA2^S-M2nls transactivators. (b) Recombinant Epo peak values obtained after three successive Dox-induction cycles at weeks 17 (23 in the rtTA2^S-S2 group), 40, and 73 in the three different groups.

4a between weeks 5 and 11 (not shown), indicating that the *off*-state phenotype can be reproducibly achieved at least as efficiently through three cycles over a 1.5-year period. To appreciate the inducibility of Epo from each construct in the presence of Dox, serum Epo concentration was measured when hematocrits reached a steady-state level. The results in Fig. 4b showed that all three transactivators were capable of secreting similar levels of Epo from the transduced muscle. Although rtTA2^S-S2 exhibited a trend toward a reduced inducibility, the difference with the two others constructs was not significant ($P > 0.05$), except at the first induction (week 23) ($P < 0.02$).

Altogether the data collected in the mouse model indicated that, when a single rAAV is used to provide both the transgene and the Dox-regulatable system, rtTA2^S-M2 is the optimal candidate with respect to both the rather tight control in the *off* state (–Dox) and the efficient transactivation of the Epo transgene in the *on* state (+Dox). Additionally, positioning the two promoters

apart from each other, and placement of the P_{tet-1} away from the ITR (Forward construct), also appeared to be required for optimal control of the transgene expression.

Validation in the Nonhuman Primate Model

To validate these observations further in the macaque, we constructed a single rAAV vector encoding the macaque Epo cDNA under the control of the rtTA2^S-M2 transactivator in the Forward configuration (see Fig. 1). Compared to the vector used in mice, the only difference introduced was that the rtTA2^S-M2 transactivator was expressed under the human desmin promoter instead of the CAG, so as to favor muscle-restricted expression (P.C. *et al.*, manuscript in preparation). The vector flanked by the AAV-2 ITRs was encapsidated in the rAAV-2 capsid and also in serotype-1 virions using the helper plasmid pXR1, which allowed efficient packaging of AAV-2 ITR vector into a rAAV-1 shell [23]. The rationale for using serotype-1 against serotype-2 rAAV was based on previous studies that demonstrated that rAAV-1 mediates much higher levels of transduction in murine and canine skeletal muscle compared to rAAV-2 [23,25,26]. Therefore, we concluded that this characteristic combined with the WPRE sequence would provide highly stringent conditions to test our vector construct in the *off* state in the nonhuman primate model. We injected a total of eight macaques with various amounts of rAAV-2 (Mac 9 through Mac 12) and rAAV-1 (Mac 13 through Mac 16) (Table 1) and started Dox-induction cycles 8 weeks later. Table 1 summarizes Epo levels measured before rAAV injections (control baseline level) and 8 weeks later prior to the first induction cycle to evaluate the capacity of the rAAV construct to control Epo expression in the *off* state (–Dox). The peak levels obtained at the first induction cycle showed a rather tight correlation among each serotype, between the amount of rAAV vector injected and transgene expression. Indeed, 4 times fewer rAAV-2 particles (Macs 11 and 12) injected resulted in 5.4 times

less Epo concentration, and 28 times fewer rAAV-1 particles (Macs 15 and 16) resulted in 23 times less recombinant serum Epo expression. Results shown in Table 1 also confirm in the primate model that, for an equal number of particles administered (6.7×10^{11} vector genomes (vg)/kg), rAAV-1 vector (Macs 13 and 14) was responsible for a 1-log increase in primate muscle transduction compared to the rAAV-2 serotype (Macs 9 and 10), with average Epo concentrations of 1296 and 129 mU/ml, respectively. This original observation can also be deduced by comparing Macs 11 and 12 with Macs 15 and 16 since, in this case, rAAV-1 was found 14 times more efficient than rAAV-2 vector. Another relevant finding was the remarkably tight control of the transgene expression during the *off* state (–Dox) in animals that expressed ≤ 162 mU/ml Epo, representing ≈ 50 times the control baseline Epo level (≈ 3 mU/ml). The two individuals that expressed the highest levels of Epo exhibited divergent behavior in the *off* state. Indeed, Mac 14 had 9 times the Epo level found before rAAV-1 injection, demonstrating a serious inability to control Epo expression in the *off* state. However, in Mac 13 the overall result was rather impressive due to the fact that Epo expression was induced up to 573 times normal levels in the *on* state and limited to 2.7 times that of the control baseline level in the *off* state. The latter macaque was followed for 9 months and subjected to six Dox-induction cycles. Fig. 5 displays the course of Epo concentration in this individual (Mac 13). Obviously, at each induction, rAAV serotype-1 supported high levels of Epo secretion from the genetically modified muscle with Epo concentrations ranging from 644 (peak 6) to 2270 (peak 4) mU/ml. Despite this high secretion capacity in the *on* state, we found little leakage before the first induction (mean Epo 6.8 ± 2.2 mU/ml) (Fig. 5, see area b) compared to the endogenous Epo measured in the period preceding the injection of the vector (mean Epo 2.5 ± 0.7 mU/ml) (Fig. 5, area a). Unfortunately, the following inductions (Fig. 5,

TABLE 1: Comparative analysis in eight nonhuman primates of rAAV-1 and -2 vectors encoding for the rtTA2^S-M2 in the forward orientation

	Animal	Injected dose (vg/kg)	Hematocrit (%)		Serum Epo concentration (mU/mL)		
			Before AAV injection ($t = 0$)	Before first Dox induction ($t = +8$ weeks)	Before AAV injection ($t = 0$)	Before first Dox induction ($t = +8$ weeks)	First peak ($t = +9$ weeks)
rAAV-2	Mac 9	6.7×10^{11}	41.2 ± 1.5	42.2 ± 1.8	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.7	97
	Mac 10	6.7×10^{11}	46.0 ± 1.6	49.2 ± 1.3	3.4 ± 0.4	2.3 ± 0.4	162
	Mac 11	1.7×10^{11}	43.5 ± 0.9	43.8 ± 0.8	2.5 ± 0.6	3.3 ± 1.0	14
	Mac 12	1.7×10^{11}	44.2 ± 0.7	44.9 ± 1.1	2.3 ± 0.5	2.0 ± 0.1	34
rAAV-1	Mac 13	6.7×10^{11}	48.9 ± 0.7	49.1 ± 1.8	2.5 ± 0.7	6.8 ± 2.2	1434
	Mac 14	6.7×10^{11}	46.3 ± 1.1	53.6 ± 5.0	3.0 ± 0.1	27.3 ± 21.9	1159
	Mac 15	2.4×10^{10}	47.7 ± 1.6	46.3 ± 1.4	1.7 ± 1.2	1.8 ± 1.0	61
	Mac 16	2.4×10^{10}	47.3 ± 1.6	46.4 ± 1.8	1.8 ± 1.0	2.0 ± 0.7	50

Focus was made on the baseline Epo levels vs the peak value obtained during the first Dox-induction cycle (after 2 months post-rAAV administration).

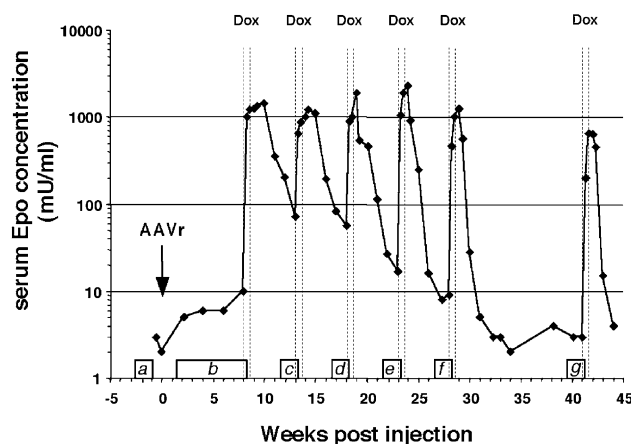


FIG. 5. Performance in a nonhuman primate of a rAAV-1 vector encoding the rtTA2^S-M2 in the Forward orientation. Vector (6.7×10^{11} vg/kg) was administered intramuscularly (bold arrow) and 5-day induction cycles (indicated as “Dox”) were initiated 2 months post-vector injection at weeks 8, 13, 18, 23, 28, and 44. Recombinant Epo was reported in mU/ml as determined by ELISA (see Materials and Methods).

areas c, d, and e) were repeated too rapidly, resulting in Epo concentrations of, respectively, 72, 56, and 17 mU/ml immediately before the following induction cycle. We suspect that the use of the WPRE sequence was greatly responsible for the slow decrease in serum Epo concentration. Consistently, the lack of such element was associated with a rapid decline in recombinant Epo secretion [10]. However, the last two cycles reached a complete steady-state baseline level. Indeed, we found 9 and 3 mU/ml Epo (Fig. 5, areas f and g, respectively), indicating that 9 months post-rAAV administration, the vector construct used was able to maintain a rather effective but not complete control of the transgene expression in the *off* state (–Dox). Again, this is even more significant considering that the last cycle (+9 months post-vector administration) resulted in 215 times the control baseline Epo level determined in area a of Fig. 5. Altogether, the actual vector design flanked by AAV-2 ITRs appeared optimal in the nonhuman primate model, in terms of both inducibility and its tight control in the absence of the inducer.

DISCUSSION

The original tetracycline-dependent system using the rtTA (Tet-on) transactivator [5] displayed a baseline activity in the *off* state (–Dox), in rAAV [9,10], adenovirus [27], or retrovirus [28] vectors. Leaking of the promoter is not desirable, especially when therapeutic proteins, such as growth factors, are effective at low doses. So far, two different strategies to circumvent this limitation have been described. On one hand, coexpression of the tetracycline-regulated repressor tTS^{kid} proved capable of significantly reducing the baseline activity of rtTA [29]. On

the other hand, two novel rtTA variants, called rtTA2^S-M2 and rtTA2^S-S2, were recently codon-optimized for expression in eukaryotic cells and described with a lower basal activity [13]. A third one, rtTA2^S-M2nls, undescribed previously and designed to increase nuclear localization of the transactivator and therefore its effectiveness [30,31], is also available for evaluation. Both strategies combined in a single recombinant adenovirus resulted in no baseline activity, good inducibility, and high responsiveness to Dox *in vivo* [32]. The same approach using rAAV vectors required a “double vector” strategy in which the constitutively expressed regulator genes were combined in one vector, while the inducible transgene was on a separate vector [33,34]. Indeed, the association of both regulator genes, the tTS^{kid} (846 bp) and the rtTA (790 bp), together with the promoter and pA sequence(s) occupies almost two-thirds of the rAAV genome maximum size, which restricts cloning capacity for a therapeutic gene and its promoter to less than 1.5 kb. However, for clinical trials, a single rAAV encoding both regulator and inducible genes would be of great interest with respect to safety and dosage control issues.

Therefore the present study explored the “single vector” strategy in which the recent versions of the rtTA transactivator, cloned in different orientations with respect to the transgene, were first evaluated in the murine model, in both *off* and *on* states. We used the sensitive Epo reporter gene and, to enhance further the model stringency, added the WPRE sequence [16,17]. The optimal candidate was then tested in nonhuman primates using rAAV serotypes 1 and 2. The mouse model showed that when both promoters driving the expression of the transgene and the rtTA2^S-M2 transactivator were positioned apart from each other, but oriented in the same direction (not opposed), inducibility was optimal and background activity in the absence of the inducer remained minimal. However, transcriptional regulation was lost when the two promoters were cloned next to each other and oriented outwardly. Corresponding results were described with a similar arrangement in helper-dependent adenovirus vector [32] and electroporated naked plasmids [35] *in vivo*. As expected, Baron and Bujard [36], by separating P_{tet}-1 from the promoter driving the transactivator gene expression with a 5-kb insert, rescued Dox regulation of transgene expression. Obviously, also in our setup of head-to-head configuration, promoter cross-talk occurred between the CAG promoter driving the rtTA2^S-M2 transactivator and the minimal P_{tet}-1 promoter driving Epo expression.

Comparing side-by-side the rtTA2^S-M2, rtTA2^S-S2, and rtTA2^S-M2nls transactivators in the Forward configuration, we found that rtTA2^S-M2 was the optimal candidate in the *off* state (–Dox). Even if it had a trend to be more potent in the *on* state (+Dox), it remained nonsignificantly different from rtTA2^S-S2 and rtTA2^S-M2nls transactivators. Recently, a similar conclusion was made *in vitro* after

transfection of plasmids encoding either the rtTA2^S-M2 or the rtTA2^S-S2 transactivators along with the tTS^{kid} repressor and the Epo gene [37]. Indeed, in HeLa and Hep3B cells, the -S2 version exhibited induced activity $\approx 30\%$ lower than that of -M2. However, this difference may be relative and subject to other factors since in the absence of the tTS^{kid} repressor, the -S2 version proved to be the most effective construct *in vitro* [35].

Overall, we concluded from the mouse studies and real-time quantitative PCR that with an average rAAV vector copy number of 0.18 per diploid cell, the rtTA2^S-M2 transactivator cloned away from the P_{tet}-1 promoter but in the same orientation (Forward construct) displayed the most desirable background activity and inducibility. Moreover, these important features were maintained over a 1.5-year period. However, we believe that the Opposite construct vector may actually have similar performance *in vivo* in the *on* state because the average rAAV copy number ratio between the two groups (0.23/0.07 = 3.3) corresponded approximately to the maximum Epo-induced secretion ratio as well (86/21 mU/ml = 4.1). The Opposite construct offers a slightly larger cloning capacity because of the use of a single pA signal instead of two, which could be a decisive advantage with respect to vector packaging efficiency [38]. However, the consequence of a bidirectional pA signal on the Dox-regulatable system achievement remains to be determined, as well as the possible interference of the AAV ITR on the P_{tet}-1 promoter activity when cloned next to each other. Such cross talk between the P_{tet}-1 promoter and viral *cis*-acting elements was previously documented when the Dox-regulatable system was cloned in a Moloney-derived retroviral vector. In that case, a dramatic increase in the relative regulation level of the reporter gene was observed only with the vectors that had various deletions in the retroviral LTR, especially of the viral enhancer/promoter sequences [28]. Accordingly, self-inactivating HIV vectors encoding the rtTA2^S-M2 transactivator and the β -galactosidase reporter gene were successfully used *in vivo* in rat brain with no detectable transgene transcription in the *off* state [39].

We, next, tested the optimal vector construct in the nonhuman primate, generally considered a more relevant preclinical model especially in the context of high transduction levels when baseline promoter activity in the *off* state is a critical output. Since previous studies documented higher levels of transgene expression using a rAAV-1 vector in murine [25,40], and canine [26] skeletal muscle, we sought to determine whether these results could be extended to nonhuman primates. Our results demonstrated for the first time that, based on recombinant serum Epo concentration, rAAV-1 vector is at least 10 times more efficient than rAAV-2 in transduction of primate skeletal muscles. Because of ongoing immunological studies with this particular cohort, we did not explore vector quantification and distribution in the

muscle tissue nor determined the proportion of slow vs fast genetically modified myofibers. However, the superior efficiency of rAAV-1 compared to rAAV-2 in 10- to 16-kg hemophilia B dogs was at least partly due to higher gene copy number and higher numbers of muscle cells transduced [26]. The overall conclusion from our macaque study was that the Dox-regulatable system exhibited better performance in the primate than in the murine model. Indeed, a minimum of ≈ 50 - (Mac 10) to ≈ 200 -fold induction (Mac 13, see Fig. 5, area g vs sixth peak value of 644 mU/ml) was compatible with a complete absence of activity in the *off* state, whereas in the mouse a 20-fold induction was already accompanied by a significant baseline Epo expression (Fig. 2). In the two animals that received 6.7×10^{11} vg/kg of rAAV-1 (Macs 13 and 14), recombinant serum Epo concentrations were the highest with induction increase of, respectively, 574- and 386-fold calculated from the Epo levels found at the first induction cycle. However, both animals showed a relatively high basal expression of Epo in the *off* state under conditions of particularly efficient tissue transduction. It is not unexpected that at elevated intracellular copy numbers the concentration of transactivator in the cell reaches levels that activate P_{tet}-1 in the absence of Dox due to the residual affinity of rtTA2^S-M2 for *tetO*. Another possibility, which our experimental setting did not evaluate, is the existence of a basal activity of the tetracycline-dependent minimal promoter P_{tet}-1 in the non-transactivator-bound state. It was only when Epo secretion in Mac 13 was reduced to 644 mU/ml at the sixth induction cycle that Epo level in the *off* state was identical to that of the pre-rAAV administration values (Fig. 5, area g).

In summary, we were able to achieve substantial transgene regulation using the rtTA2^S-M2 transactivator together with a sensitive and quantifiable Epo/WPRE reporter system, both cloned in a Forward orientation and in a single rAAV vector. We acknowledge that, if the single-vector approach is advantageous with respect to safety and dosage issues, it is likely less efficient than the double-vector strategy in avoiding transcriptional leakage in the *off* state [33,34]. However, here we demonstrated in nonhuman primates with an optimal rAAV vector design that an induction of up to 200-fold was compatible with no background activity from genetically modified muscle. This may be largely sufficient in most therapeutic situations requiring tight regulation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid Constructions

Generating the expression cassette encoding Epo (P_{tet}-1-Epo-WPRE-pA). The WPRE sequence [17] was inserted in the multiple cloning site at the *PvuII* site in the pTRE2 plasmid [5] downstream of the P_{tet}-1 promoter. The P_{tet}-1/WPRE sequence was cloned into the pBS plasmid (Stratagene) at the blunted *XhoI* and *BamHI* sites. The pA signal was cloned downstream of the WPRE sequence at the blunted *Clal* and *HindIII* sites. The murine

Epo cDNA (kindly provided by Delphine Bohl, Institut Pasteur, Paris) was inserted between the P_{tet} -1 and the WPRE motifs at the *Bam*HI site. The entire P_{tet} -1-Epo-WPRE-pA fragment (2200 bp) was excised using *Xho*I/*Hind*III, blunted, and inserted into the pSSV9 at the blunted *Xba*I sites [18] generating pSSV9.mET. A *Spe*I linker was introduced at the *Xho*I site between the *tetO*.CMV promoter and the AAV ITR. The equivalent construct encoding the *Macaca fascicularis* (cynomolgus) Epo cDNA was derived from pSSV9.mET from which the murine Epo was removed by *Bam*HI digestion, generating the plasmid pSSV9.cmET-CAG.rtTA.pA.

Generating the expression cassette encoding the new versions of the Dox-sensitive transactivator (CAG-rtTA2^S-S2 or rtTA2^S-M2 or rtTA2^S-M2nls-pA). The fragment (2281 bp) made of the CAG chimeric promoter [19], the Dox-sensitive transactivators (rtTA2^S-S2, rtTA2^S-M2, and rtTA2^S-M2nls), and the bovine growth hormone polyadenylation signal was inserted 5' → 3' in plasmid pBS-KS(+) (Stratagene).

The complete AAV vector plasmid, encoding Epo and the transactivator, was ultimately obtained as follows: *Spe*I linkers were introduced on both sides and the whole CAG.rtTA2.pA cassette was subsequently cloned into the newly introduced *Spe*I site of pSSV9.mET, generating pSSV9.mET-CAG.rtTA.pA. The ligation products yielded both the Forward and the Reverse orientations (see Fig. 1). The Opposite construct was derived from a previously described vector [9], but in which the WPRE sequence was introduced between the murine Epo and a bidirectional SV40 pA signal. The final construct used in macaques was derived from the pSSV9.cmET-CAG.rtTA.pA plasmid in the Forward configuration, and in it the CAG chimeric promoter was replaced by a 1-kb human desmin promoter [20].

rAAV Production

rAAV-2 vector stocks were produced by cotransfection of 293 cells with 12.5 µg of vector plasmid and with 25 µg of the transcomplementary plasmid pDG [21] per 15-cm plate as described [22]. Purification of rAAV-2 particles was done by iodixanol gradient followed by heparin column chromatography. The same vector cassettes flanked by AAV-2 ITRs were encapsidated in AAV-1 capsids as described [23] and purified by three cesium chloride gradients. Both rAAV-2 and rAAV-1 vector stocks were extensively dialyzed against Ca^{2+}/Mg^{2+} -containing PBS. The rAAV-2 and -1 titers were determined by dot-blot analysis to provide the number of vector genomes per milliliter based on the quantification of DNase-resistant viral DNA against known quantities of vector plasmid [24].

Intramuscular Injection of rAAV Vector and Dox Administration

Six-week-old male C57BL/6 mice (Iffa-Credo, Orléans, France) were anesthetized with intraperitoneal xylazine and ketamine (7 and 70 mg/kg, respectively). Thirty microliters of rAAV-2 stocks diluted in PBS was injected in each anterior tibialis. As indicated in the text and legends, animals received either 6×10^7 or 2×10^8 infectious particles. Doxycycline (Ronaxan P.S 5%; Merial, France) was dissolved in the drinking water to a final concentration of 200 µg/ml with 5% sucrose.

Nonhuman primates were captive-bred cynomolgus macaques purchased from the Centre de Recherches Primatologiques, Ferny. Neutralizing assays carried out in the laboratory indicated that prior to vector administration, these animals did not have neutralizing antibodies against rAAV-2 and -1 particles. Anesthesia was performed with ketamine (10 mg/kg) before rAAV intramuscular delivery. Total volume per injection site was 400 µl and each animal received 2.4×10^{10} to 6.7×10^{11} vg/kg of either rAAV-2 or rAAV-1 serotypes (see Table 1) resulting in one to five injection sites in the left anterior tibialis muscle. Because we found that water intake varied substantially among animals, Dox (Vibravineuse; Pfizer) was given intravenously (10 mg/kg of body weight). The induction protocol consisted in 5 days Dox administration followed by the next induction 1 month later as described in [10]. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes.

In Vivo Transgene Regulation Analysis

Mice were bled (10 µl) every week by retro-orbital puncture for hematocrit determination. Serum Epo levels were determined from 300 µl of blood

when hematocrit reached a steady state either in the *off* or in the *on* Dox-induced state. Serum Epo levels were determined by an ELISA optimized by Sarah Radecke (Transfusionsmedizin, Universität Ulm, Germany). Briefly, 96-well plates were coated overnight with a rabbit anti-human erythropoietin and subsequently saturated with rabbit serum (Sigma). Standard curves were obtained using known amounts of recombinant murine erythropoietin (Boehringer). Rabbit anti-mouse Epo-biotin-conjugated antibody was used as secondary antibody and revealed by an alkaline phosphatase-conjugated anti-biotin antibody from goat (Sigma A-7064) using *p*-nitrophenylphosphate as substrate (Sigma).

Serum from macaques was collected under ketamine-induced anesthesia and Epo levels were measured by ELISA (Quantikine IVD; R&D Systems).

Quantitative PCR Analysis

DNA was extracted using the following buffer: 8 M urea, 1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM EDTA, and 300 mM NaCl, containing 500 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim). Genetically modified muscle from each mouse was digested overnight at 55°C and then subjected to phenol-chloroform extraction. DNA was precipitated in 100% ethanol containing 0.2 M NaCl. DNA was resuspended in water. Amounts of genomic DNA after extraction were determined fluorometrically (Dyna Quant 200; Hoefer). Quantitative PCR was conducted on an ABI Prism 7700 sequence detection system using 5 and 10 ng of genomic DNA. The 2× SYBR Green Master Mix was used according to Applied Biosystems' recommendations. Transgene copy number was determined using primers designed to amplify the WPRE sequence and genomic DNA copy number with primers designed to amplify the murine CCR5 gene. For each sample C_t values were compared to those obtained with plasmid standard dilutions containing WPRE and mCCR5 sequences. The ratio between transgene and genomic DNA copy number provided the amount of transgene copy per cell. Size of amplicons and the absence of nonspecific amplification in mock-injected animals were checked on a 3% agarose gel. Thermal cycler conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Primers were WPRE, 5'-AGGTGGCAACACAGGCGA-3' (forward) and 5'-TTGGGCACCTGACAATTCG-3' (reverse), and mCCR5, 5'-GTCCTCCTCTGACCACCTTC-3' (forward) and 5'-GCAGCAGTGTGTTTCATTCAG-3' (reverse).

Statistical Analysis

Statistical analyses were made using unilateral or bilateral Student *t*-test. Results were considered significantly different when $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Matthew Ellinwood for critical reading and editing. We also thank the Vector Core (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr/>) at the University Hospital of Nantes, supported by the Association Française contre les Myopathies, the INSERM, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire. This work was also supported in part by GM059299, DK05934, HL 015818, and HL066973.

RECEIVED FOR PUBLICATION NOVEMBER 5, 2003; ACCEPTED DECEMBER 26, 2003.

REFERENCES

1. Muzyczka, N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **158**: 97–129.
2. Snyder, R. O. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J. Gene Med.* **1**: 166–175.
3. Manno, C. S., et al. (2002). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **19**: 19.
4. Monahan, P. E., and Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol. Med. Today* **6**: 433–440.
5. Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5547–5551.
6. Wang, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., and O'Malley, B. W. (1996). Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **15**: 239–243.
7. No, D., Yao, T. P., and Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3346–3351.

8. Rivera, V. M., *et al.* (2002). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Med.* **2**: 1028–1032.
9. Bohl, D., Salvetti, A., Moullier, P., and Heard, J. M. (1998). Control of erythropoietin delivery by doxycyclin in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* **92**: 1512–1517.
10. Favre, D., *et al.* (2002). Lack of immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol.* **76**: 11605–11611.
11. Hillen, W., and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345–369.
12. Gossen, M., *et al.* (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766–1769.
13. Urlinger, S., *et al.* (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7963–7968.
14. Flotte, T. R., *et al.* (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J. Biol. Chem.* **268**: 3781–3790.
15. Haberman, R. P., McCown, T. J., and Samulski, R. J. (2000). Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J. Virol.* **74**: 8732–8739.
16. Loeb, J. E., Cordier, W. S., Harris, M. E., Weitzman, M. D., and Hope, T. J. (1999). Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**: 2295–2305.
17. Zufferey, R., Donello, J., Trono, D., and Hope, T. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**: 2886–2892.
18. Samulski, R. J., Chang, L. S., and Shenk, T. (2002). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* **63**: 3822–3828.
19. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1989). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**: 193–199.
20. Li, Z., and Paulin, D. (1991). High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer. *J. Biol. Chem.* **266**: 6562–6570.
21. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., and Kleinschmidt, J. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2745–2760.
22. Favre, D., *et al.* (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* **4**: 559–566.
23. Rabinowitz, J. E., *et al.* (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.* **76**: 791–801.
24. Salvetti, A., *et al.* (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* **9**: 695–706.
25. Xiao, W., *et al.* (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J. Virol.* **73**: 3994–4003.
26. Arruda, V. R., *et al.* (2004). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* **103**: 85–92.
27. Fender, P., *et al.* (2002). Controlled transgene expression by E1–E4-defective adeno-virus vectors harbouring a “tet-on” switch system. *J. Gene Med.* **4**: 668–675.
28. Lindemann, D., Patriquin, E., Feng, S., and Mulligan, R. C. (1997). Versatile retro-virus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Med.* **3**: 466–476.
29. Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., and Bujard, H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* **1**: 4–12.
30. Smith-Arica, J. R., *et al.* (2000). Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression. *Mol. Ther.* **2**: 579–587.
31. Smith-Arica, J. R., *et al.* (2000). Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology* **142**: 2521–2532.
32. Salucci, V., *et al.* (2002). Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther.* **9**: 1415–1421.
33. McGee Sanftner, L. H., *et al.* (2001). Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol. Ther.* **3**: 688–696.
34. Rendahl, K. G., *et al.* (2002). Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* **13**: 335–342.
35. Lamartina, S., *et al.* (2002). Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum. Gene Ther.* **13**: 199–210.
36. Baron, U., and Bujard, H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* **327**: 401–421.
37. Lamartina, S., *et al.* (2003). Construction of an rTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol. Ther.* **7**: 271–280.
38. Dong, J. Y., Fan, P. D., and Frizzell, R. A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **7**: 2101–2112.
39. Koponen, J. K., *et al.* (2003). Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rTA2(S)-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **10**: 459–466.
40. Chao, H., *et al.* (2000). Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol. Ther.* **2**: 619–623.

2.2 Discussion du premier article

2.2.1 *Efficacité de la régulation*

Le système de régulation a globalement été amélioré. Même s'il peut paraître hasardeux de comparer des études faites avec 5 ans d'écart, il est intéressant de faire un parallèle avec l'étude du groupe de Jean Michel Heard (Bohl et al., 1998). Il faut d'abord souligner la sensibilité du système hématopoïétique, puisqu'une augmentation faible de la sécrétion d'Epo entraîne une augmentation significative de l'hématocrite qui, compte tenu de la faible sensibilité de la méthode de dosage de l'érythropoïétine murine utilisée (Dr. Sarah Radecke, Ulm, Allemagne), se présente comme une valeur sûre pour juger des fuites sur un groupe d'individus homogènes. A l'inverse, les valeurs d'hématocrite « plafonnent » en réponse à de fortes doses d'Epo sécrétées si bien que seul le dosage de l'Epo sérique permet de mesurer le niveau d'induction.

Il faut ensuite remarquer l'importance de la dose de vecteurs injectée. Les souris ayant reçu trois fois moins de vecteurs que le premier groupe (construction M2-FOR, de 2.10^8 à 6.10^7 particules infectieuses (p.i) par animal ; fig. 2 et 4a respectivement du premier article) ne montrent pas de fuite détectable 10 semaines après injection. Cette observation est importante car elle montre que la marge laissée par le système est faible et qu'il ne faudrait pas conclure à tort que l'on dispose d'un système complètement verrouillé. L'étude de Delphine Bohl avait apporté des résultats similaires, une dose injectée deux fois moindre donnait un taux de fuite significativement inférieur. Toutefois, quelle que soit la dose injectée, les animaux présentaient une expression basale d'Epo en l'absence d'inducteur, alors que le niveau d'induction était similaire à ce que nous avons obtenu (10 à 20 fois le taux d'Epo sécrété à l'état non induit). Il faut aussi remarquer que, dans notre étude, celui-ci varie au cours des inductions (fig. 4b, construction M2-FOR, les niveaux d'Epo sécrétés varient du simple au double au cours de trois inductions successives, même s'il n'y a pas de différence significative). La fuite observée avec la construction M2-FOR indique que la version optimisée rtTA2^S-M2 aurait une affinité pour les séquences opératrices Tet-O en l'absence d'inducteur.

Il n'en reste pas moins que, si l'on pondère nos résultats à la quantité d'ADN transféré mesurée par PCR quantitative (fig. 3), la construction « Forward » (cassettes clonées dans le même sens) permet une efficacité de la régulation supérieure à la construction « Opposite » (construction proche de celle utilisée par le groupe de Jean Michel Heard, cassettes en sens opposés séparées par un pA bidirectionnel). La détermination du nombre de copies par quelle que méthode que ce soit n'indique en rien le nombre de formes transcriptionnellement actives. Le meilleur contrôle serait la quantification de l'expression du rtTA2^S-M2 par une technique basée sur le Western blot. Cette méthode n'a pu être mise en œuvre, faute de sensibilité. Toutefois, les préparations virales ont été injectées en même temps à des groupes d'animaux homogènes et les génomes des vecteurs (M2-FOR, M2-REV, M2-OPP) sont de tailles comparables, on peut penser que le ratio entre le nombre de copies de transgène détectables et la quantité de formes transcriptionnellement actives est conservé entre les groupes.

Ces résultats sont confirmés en partie par les études précédentes faites avec des vecteurs adénoviraux (Salucci et al., 2002) ou plasmidiques (Lamartina et al., 2002). L'une d'elles confirme qu'une stratégie à deux vecteurs (Salucci et al., 2002) est moins efficace qu'une stratégie à un seul vecteur, et donne un niveau d'expression du transgène inférieur, probablement du fait d'aléas de transduction combinés de chaque vecteur. Une étude utilisant des vecteurs lentiviraux a aussi conclu qu'une stratégie à deux vecteurs était moins efficace qu'une stratégie à un seul vecteur (Vigna et al., 2002). Lorsque les cassettes d'expression sont clonées dans un seul vecteur en orientation « Reverse », les constructions fuient en l'absence d'inducteur, probablement à cause d'interactions entre l'enhancer du promoteur fort CMV (Salucci et al., 2002) (Lamartina et al., 2002) et le promoteur CMV minimal du P_{tet}-1. Ces interactions sont limitées lorsque les cassettes sont séparées par des séquences isolatrices (Salucci et al., 2002), si bien que l'efficacité de la régulation devient comparable aux versions « Forward ».

Nous avons conclu que la version rtTA2^S-M2 permet un meilleur niveau de régulation que la version rtTA2^S-S2, avec des différences faibles toutefois. Aux doses d'inducteurs utilisées, le rtTA2^S-M2 permet un meilleur niveau d'induction que le rtTA2^S-S2. Les travaux de Lamartina et al (Lamartina et al., 2002) confirment que la version rtTA2^S-M2 permet des taux d'Epo sécrétés supérieurs à la version rtTA2^S-S2 chez la souris Balb/c recevant des doses équivalentes de doxycycline *per os* (200 µg/mL dans l'eau de boisson). Les différences observées en l'absence d'inducteur sont également très faible, mais les auteurs concluent que

le version rtTA2^S-S2 induit le niveau de fuite le plus faible. Le parallèle entre cette étude et la nôtre montre que les versions rtTA2^S-M2 et rtTA2^S-S2 sont très proches.

Les résultats obtenus avec la construction M2-FOR chez la souris ont été partiellement reproduits chez le singe. Les animaux ayant reçu les doses les plus faibles d'AAV-1 (Table 1, Mac 15 et 16) et ceux ayant reçu de l'AAV-2 (Table 1, Mac 9 à 12) ne présentent pas de fuite détectable, aussi bien du point de vue des valeurs d'Epo sériques mesurées avant la première induction dans les 2 mois suivant l'injection, que de leur formule sanguine (hématocrite, taux de réticulocytes notamment, non montré). Les niveaux d'induction sont plus élevés que pour les souris (niveau d'induction d'environ 50, Mac 9 et Mac 10). Les raisons de cette divergence ne sont pas claires. Signalons qu'il est difficile de comparer la dose de vecteurs injectés entre les souris et les primates. La dose et la voie d'administration de la doxycycline (eau de boisson contre injections contrôlées de doxycycline) influent à n'en pas douter sur la concentration intracellulaire d'inducteur qui, on le sait, a une répercussion sur le niveau d'induction *in vitro* (Urlinger et al., 2000) et *in vivo* (Samakoglu et al., 2002)). Mais surtout ces différences pourraient être dues aux caractéristiques mêmes des constructions utilisées. Pour l'étude chez le primate, nous avons remplacé le promoteur ubiquitaire fort CAG par un promoteur dérivé de la desmine humaine (construction 1kb, provenance D.Paulin, (Li and Paulin, 1991)). La littérature ne mentionne aucune comparaison de ces deux promoteurs. Des travaux non publiés d'E.Zeïra (Eitan Galun, Jerusalem, Israël) montrent qu'après électroporation dans le muscle de souris ces deux promoteurs permettent une expression du transgène (luciférase, 21 jours post injection) presque 100 fois supérieure comparé au CMV et que le CAG permet une expression environ 10 fois supérieure que le promoteur Desmine. On peut donc penser que le niveau d'expression du rtTA varie dans cet ordre de grandeur. Si les doses de vecteurs injectées permettent d'obtenir un niveau d'expression élevé chez les primates, le « faible » niveau d'expression du rtTA serait responsable de l'absence de fuite détectable. Il est en effet déjà été décrit que la concentration nucléaire en rtTA joue un rôle direct dans la régulation de l'expression du transgène par la doxycycline (Urlinger et al., 2000) (Smith-Arica et al., 2000) (Smith-Arica et al., 2001).

Mais il faut surtout dire qu'en comparaison avec l'étude de Favre et al (Favre et al., 2002), l'efficacité de la régulation a été améliorée, pour des doses de vecteurs et d'inducteur administrées équivalentes (de 3.10^9 à 1.10^{10} particules infectieuses (p.i)/kg d'AAV-2 pour Mac 5 à 8 (Favre et al., 2002)), $1,1.10^{10}$ p.i/kg d'AAV-2 dans notre étude pour Mac 9 et Mac

10). Ce résultat est d'autant plus important que nous utilisons une séquence WPRE. Là encore il est difficile de savoir quel élément (orientation des cassettes, rtTA2^s-M2, promoteur Desmine) est déterminant. Il est possible d'avoir un taux d'induction de près de 50 (Mac 9 et 10) sans expression basale du transgène en l'absence d'inducteur, ce qui rendrait le système utilisable dans des applications cliniques. Toutefois le système présente des limites. Si les animaux ayant reçu les doses les plus « fortes » d'AAV-1 (Mac 13 et 14) présentent des taux d'Epo près de 500 fois le taux physiologique, leur taux d'Epo sécrété est significativement plus élevé avant la première induction. Ceci est corrélé à une réticulocytose (non montré) et à une augmentation de l'hématocrite.

Des outils adaptés du système Tet-Off permettent de réprimer l'expression du transgène, utilisant soit une protéine tTS (*tetracycline controlled Transcriptional Silencer*) (Freundlieb et al., 1999) ou Tet-KRAB (Deuschle et al., 1995)).

La protéine tTS est constituée de la partie Tet-R du tTA (système Tet-Off), fusionnée avec un domaine de répression de la transcription. Plusieurs domaines d'inhibition ont été testés in vitro (Freundlieb et al., 1999). Le domaine KRAB dérivé de la protéine humaine Kid-1, formant la protéine tTS^{Kid} après fusion avec Tet-R, est le plus efficace. Afin d'éviter la formation de dimères avec le rtTA coexprimé dans la cellule, le domaine Tet-R a été modifié. Couplé avec le rtTA de première génération, le tTS a été utilisé chez le rongeur, après transfert au moyen d'un AAV dans le muscle (Rendahl et al., 2002) (Perez et al., 2002) ou la rétine (McGee Sanftner et al., 2001) ou après électrotransfert d'ADN plasmidique (Apparailly et al., 2002) (Lamartina et al., 2003). Le système permet une répression totale de l'expression du transgène en l'absence de Dox. Même si aucune comparaison n'a été faite avec le rtTA seul chez l'animal, le potentiel d'induction n'est apparemment pas affecté in vitro (Freundlieb et al., 1999). Il s'avère toutefois qu'in vivo, les taux d'Epo atteints sont inférieurs à ceux atteints avec un promoteur constitutif fort seul (CMV) (Rendahl et al., 2002). De plus, il faut être capable de maîtriser les quantités relatives de rtTA et de tTS, il apparaît en effet qu'un excès de rtTA gênerait l'action du tTS (Fender et al., 2002) (par compétition au niveau des séquences opératrices vraisemblablement). Enfin, la taille du système véhiculé nécessite un clonage dans deux vecteurs séparés (Rendahl et al., 2002) (Perez et al., 2002).

Le système Tet-KRAB utilise une protéine de fusion entre la partie TetR du tTA et le domaine de répression de la transcription KRAB dérivé de la protéine humaine Kox1

(Deuschle et al., 1995). Il nécessite de remplacer le promoteur CMV minimal en aval des séquences opératrices TetO par un promoteur fusionné à un enhancer, actif lorsque le domaine KRAB n'est plus fixé. Le système est donc inductible à la doxycycline. Il faut remarquer que les capacités d'induction sont dépendantes du promoteur remplaçant le CMVmin. Ce système n'a été évalué qu'*in vitro* (Wiznerowicz and Trono, 2003).

2.2.2 Utilisation de l'AAVr de sérotype 1 dans le muscle de primate

Notre étude constitue la première publication de transfert de gène utilisant l'AAV-1 dans le muscle squelettique de primate. Il s'agit plus globalement de la première utilisation d'AAV-1 recombinant en Europe chez le primate. Il est également utilisé par le groupe de Jim Wilson (Rivera, non publié) aux Etats-Unis.

Cette évaluation chez le primate est importante, puisqu'il est primordial de disposer d'un vecteur qui transduise efficacement le muscle chez l'homme. Les essais cliniques utilisant de l'AAV-2 chez des patients hémophiles montrent que les taux de facteur IX sécrétés sont en deçà du seuil thérapeutique (moins de 1% du taux physiologique) (Manno et al., 2003). Le groupe de K.High évalue à ce titre l'efficacité de l'AAV-1 dans un modèle de chien hémophile (Arruda et al., 2004).

Nous avons montré que pour une même dose de vecteurs, l'AAV-1 permet une expression du transgène 10 à 20 fois supérieure à l'AAV-2. Ces résultats correspondent en partie avec les études précédentes faites chez la souris et le chien.

Comme indiqué dans la partie « transfert de gène dans le muscle », les résultats varient beaucoup d'une étude à l'autre et en fonction de la dose injectée. Les travaux du groupe de Jude Samulski (Chao et al., 2000) (Chao et al., 2001) montrent que pour des mêmes doses injectées dans le muscle de souris (10^{11} à $2,5 \cdot 10^{11}$ vg par animal d'AAV-fIX), l'AAV-1 permet une expression du transgène 100 à 1000 fois supérieure à l'AAV-2. Les travaux récents du groupe de Jim Wilson (Gao et al., 2002) (Gao et al., 2004b) montrent une augmentation d'un facteur 10 à 100 (10^{11} vg par animal d'AAV codant pour l' α_1 -

antitrypsine). Il faut toutefois remarquer que dans l'étude de Gao et al de 2002, les sérotypes 1 et 2 n'étaient pas purifiés de la même façon (chromatographie sur colonne d'héparine et gradient de densité de CsCl_2). Toutefois dans leur première étude (Xiao et al., 1999) ils montraient une augmentation d'un facteur 2 à 10 (érythropoïétine et α_1 -antitrypsine). Le groupe de Kathy High obtient des résultats similaires (Arruda et al., 2004) ; après injection de 2.10^{11} à 4.10^{12} vg/kg d'AAV-fIX chez la souris, ils observent une augmentation du taux de facteur IX sanguin d'un facteur 10 à 20. Ils confirment ces résultats chez le chien. Il faut noter que l'augmentation de l'expression du transgène est corrélée avec la détection d'un plus grand nombre de copies du gène transféré et une augmentation du nombre de cellules transduites détectées en immunofluorescence (Arruda et al., 2004). Toutefois, pour une augmentation de l'expression du transgène d'un facteur 10 à 20, le nombre de copies détectées à 12 semaines en Southern n'augmente que d'un facteur 2 à 30 en fonction de la dose injectée et le nombre de cellules transduites à 4 semaines n'augmente que d'un facteur 2 à 3. Comme dans l'étude comparative faite dans le foie avec de l'AAV-8 ((Thomas et al., 2004), voir partie « Transfert de gène dans le foie »), ceci signifierait que pour un même nombre de copies du transgène, les cellules transduites par l'AAV-1 donneraient un niveau d'expression plus élevé (Arruda et al., 2004). Cette hypothèse reste toutefois à discuter. Il faut aussi considérer qu'au regard de la sensibilité de la méthode utilisée, des cellules négatives en immunofluorescence peuvent exprimer le transgène et que, comme rappelé plus haut, les formes d'ADN détectées en Southern ne rendent pas forcément compte du nombre de formes transcriptionnellement actives. On sait en effet que le nombre de copies détectables d'AAV-2 dans le muscle diminue dans les semaines suivant l'injection, alors que l'expression du transgène augmente sur cette période (Vincent-Lacaze et al., 1999). La cinétique de décroissance de l'ADN détectable dans les cellules musculaires infectées par l'AAV-1 n'est pas établie et rien ne montre qu'elle est identique à celle de l'AAV-2, ce qui rend l'interprétation encore plus hasardeuse.

L'AAV-1 apparaît toutefois comme le sérotype le plus efficace pour le transfert de gène dans le muscle.

Nous n'avons pas quantifié l'ADN détectable à long terme après injection, du fait de phénomènes immunitaires (cf. infra). L'utilisation des nouveaux sérotypes utilisés en transfert de gène doit faire l'objet d'étude de la dissémination virale dans les organes à distance et les fluides biologiques (sérum, sécrétions, urines et fèces). Les primates, dont la morphologie et

la physiologie sont proches de l'homme, et dont les doses administrées peuvent être facilement rapportées à l'homme, constituent un modèle pré-clinique pour les études de sécurité virale. La dissémination de l'AAV-2 après injection intramusculaire avait été particulièrement bien documentée (Favre et al., 2001). L'étude de Favre et al montre une détection de particules infectieuses dans le sérum sur les 3 jours suivant l'injection et la détection en PCR du transgène dans le foie, les ganglions drainant les muscle injectés et les PBMC plusieurs mois après injection. Le transgène n'a jamais été détecté dans les gonades, écartant ainsi le risque de transmission germinale. Il en est de même pour les études faites chez la souris, le rat et le chien (Arruda et al., 2001a). Il a toutefois été montré que le transgène était détecté en PCR dans les testicules de lapin 3 mois après l'injection, mais que l'AAV-2 ne transduisait pas les cellules germinales et qu'aucun signal n'était détecté dans le sperme (Arruda et al., 2001a). L'étude de la dissémination de l'AAV-1 appliquée aux animaux utilisés dans notre étude est en cours au laboratoire (Y.Cariou, non publié).

2.2.3 Persistance de la régulation après transfert de gène dans le muscle de primate (résultats complémentaires)

Les résultats concernant Mac 13 (fig. 5 du premier article) paraissent encourageants quant à la persistance de la régulation chez le primate. Cet animal a même présenté une réponse à deux inductions réalisées 15 et 19 mois après l'injection de vecteurs. Le niveau d'induction était comparable à l'induction pratiquée à la 40^{ème} semaine (846 et 858 mUI/mL).

Toutefois ces résultats ne sont pas représentatifs de ce que nous avons obtenu, Mac 13 est le seul macaque ayant présenté une persistance de la régulation. Les 7 autres animaux n'ont plus présenté de réponse après la 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} induction, sans influence apparente du sérotype ou de la dose injectée. Après injection d'AAV-1 ou -2, un animal sur huit présente une persistance de la régulation ; ce ratio était le même dans l'étude de David Favre qui n'utilisait que de l'AAV-2. Il faut noter que la régulation persiste chez les animaux ayant les plus fortes sécrétions d'Epo et donc *a priori* les plus forts taux de rtTA.

Le système Tétracycline s'est systématiquement heurté à des problèmes de persistance dans des modèles primates, après injection d'AAVr véhiculant la première version du rtTA

(Favre et al., 2002) ou électroporation d'ADN codant pour le rtTA2^S-M2 (Latta-Mahieu et al., 2002), le groupe de Carlo Toniatti ne présente pas de résultats sur plus de 15 jours (Lamartina MolTher 2002). La régulation persiste tout de même à long terme après transfert médié par l'AAV chez la souris C3H (Bohl et al., 1998) C57Bl/6 (Chenuaud et al., 2004b) et HHD (Ginhoux et al., 2004). Ces différences seraient-elles dues à des caractéristiques particulières du tissu musculaire murin, aux doses injectées, à un mode de présentation différent, à des fonctions différentes des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) murines et simiennes ?

L'induction de la réponse immunitaire dirigée contre un épitope (immunité adaptative) nécessite l'activation de lymphocytes T CD4⁺ helper et/ou lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (pour revue, (Jooss and Chirmule, 2003) (Sun et al., 2003)). Ces derniers reconnaissent à la surface cellulaire des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), complexés à des épitopes provenant de la dégradation d'antigènes produit dans la cellule. Les antigènes dégradés sont des protéines cellulaires du soi ou des protéines du non-soi produites après infection par un pathogène. Les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissent à la surface cellulaire des molécules de classe II du CMH complexées à des épitopes issus de la dégradation d'antigènes captés dans le milieu extra-cellulaire par phagocytose, endocytose ou pinocytose. L'expression des molécules de classe II du CMH est restreinte aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA). L'activation des lymphocytes T par les CPA a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (noeuds lymphatiques, rate). Parmi celles-ci, les cellules dendritiques (CD) jouent un rôle particulièrement important dans l'initiation de la réponse immune. Une des particularités des CD est la capacité de présenter des antigènes captés dans le milieu extracellulaire sur des molécules de classe I du CMH et d'initier une réponse cellulaire (Bevan, 1976) (cité par (Sarukhan et al., 2001a) (Carbone et al., 1998)). Ce procédé est dénommé « cross-présentation » ou « *cross-priming* ».

L'activation complète des lymphocytes T nécessite différents signaux, elle résulte d'un « dialogue » avec la cellule présentatrice. Le signal 1 est la présentation du peptide antigénique sur des molécules du CMH. Le signal 2 est la costimulation par interaction entre des marqueurs membranaires des deux acteurs cellulaires (interaction des antigènes CD40 et de la famille B7 (CD 80 et CD 86) de la cellule dendritique mature avec respectivement les marqueurs CD 40-ligand et CD28 du lymphocyte). Enfin la stimulation cytokinique médiée par l'IL-12 et l'IL-2 (signal 3) initie l'expansion et la différenciation terminale des lymphocytes. Les lymphocytes activés migrent dans les tissus infectés. Une théorie récente

controversée introduit la notion de signal danger comme activant la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (signal 0) (Matzinger, 2002). Dans le cas du transfert de gène ce signal pourrait être constitué par les cytokines sécrétées lors du recrutement des acteurs de l'immunité naturelle (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α) ou des composants du vecteur lui-même (Brown and Lillicrap, 2002).

Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires activent les macrophages, les cellules NK et les éosinophiles par sécrétion de cytokines. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques lysent les cellules présentant des épitopes dérivés de l'antigène cible présentés sur des molécule de classe I du CMH. Les lymphocytes B se multiplient dans les centres germinatifs des ganglions après interaction avec un lymphocyte T CD4⁺, et migrent dans la circulation sous forme de plasmocytes sécrétant des anticorps spécifiques.

Le rôle des CD dans la réponse immune contre un transgène exogène transféré par l'AAV n'est pas encore clair. A l'origine, Jooss et al (Jooss et al., 1998) ont montré que l'AAV-2 ne transduit pas des CD spléniques de souris *in vitro*. Ces résultats ont été confirmés plus tard chez l'animal ; 12 jours après injection intramusculaire d'AAV-HA, les CD isolées des ganglions drainant l'organe cible ne présentent pas de signal spécifique du vecteur en RT-PCR (Sarukhan et al., 2001a). A l'inverse, les vecteurs adénoviraux transduisent les CD murines et des ARNm spécifiques du transgène (HA, hémagglutinine) sont détectés (Sarukhan et al., 2001a). La cinétique d'activation des lymphocytes CD4⁺ est beaucoup plus rapide après infection par l'adénovirus. Jooss et al avaient montré en hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) que les particules d'AAV s'accumulent en région périnucléaire et n'atteignent pas le compartiment nucléaire (Jooss et al., 1998). Il paraissait donc clair que si après injection d'Ad-HA, les cellules T étaient activées par transduction des CD et cross-priming, l'activation des cellules T après injection d'AAV-HA se faisait uniquement par cross-priming. L'hypothèse était fondée. Toutefois les travaux du groupe de Jim Wilson l'ont mise en doute (Zhang et al., 2000) ; des CD immatures murines obtenues par différenciation de monocytes médullaires sont transduites par l'AAV-2. Un transfert adoptif de ces CD infectées par un AAV-LacZ chez des souris ayant reçu 10 jours auparavant une injection intramusculaire du même vecteur entraîne une réponse cellulaire T cytotoxique contre la β -galactosidase et une diminution du nombre de fibres transduites. Des souris transgéniques déficientes en CD40-ligand ne développent pas de réponse immune. Un transfert adoptif de DC matures infectées ne provoque pas non plus de réponse immune. Dans le même temps,

Ponnazhagan et al (Ponnazhagan et al., 2001) montrent que des CD dérivées de monocytes humains sont transduites par l'AAV-Luc (luciférase) (CD apparemment immatures, obtenues par une culture des monocytes sur 7 jours en présence d'IL-4 et GM-CSF sans protocole de maturation). Les CD humaines infectées ont apparemment la capacité d'induire une réponse CTL contre le transgène (Chiriva-Internati et al., 2003). Le mécanisme d'entrée du vecteur dans les CD, par phagocytose (caractéristique des CD immatures) ou infection, n'est pas élucidé. Les CD expriment un fort taux d'intégrine $\alpha V\beta 5$ à l'état immature, en relation avec leurs capacités de phagocytose, et cet expression diminue à la faveur de leur maturation (Zhang et al., 2000). La présence de groupements héparan sulfate et de récepteur 1 au facteur de croissance des fibroblastes n'a pas été étudiée. Il faut également noter que la présentation de l'antigène par les CD pourrait être due à la présence de la protéine comme contaminant des préparations virales. Dans cette hypothèse les CD matures ne pourraient pas induire de réponse contre la protéine.

De plus les travaux faits dans des modèles murins de dystrophie musculaire montrent, que dans un contexte inflammatoire, l'utilisation d'un promoteur tissu-spécifique (MCK, promoteur de la créatine kinase musculaire) diminue considérablement la réaction immune contre le transgène (γ -sarcoglycan humain transféré dans un modèle de souris *gsg*^{-/-} (Cordier et al., 2001) et LacZ dans un modèle de souris *mdx* (Yuasa et al., 2002)) et permet de prolonger son expression. L'activité du promoteur MCK n'a pas été étudiée et il n'est pas clair si les différences obtenues sont dues à une expression faible du transgène sous contrôle de MCK après probable transduction de CD. De plus, dans ces modèles animaux, les myocytes sont lésés et l'absence d'intégrité de la membrane cellulaire peut favoriser la fuite des néo-antigènes dans le milieu extracellulaire, qui peuvent être cross-présentés à la faveur de l'infiltrat inflammatoire présent avant l'injection. Les caractéristiques de la réponse immune pourraient être dues à l'activité faible du promoteur MCK comparé au CMV dans un environnement musculaire (Yuasa et al., 2002), diminuant ainsi la quantité de protéine relarguées dans le tissu interstitiel.

Il faut aussi remarquer que la réponse cellulaire est nettement favorisée lorsque l'antigène est extracellulaire (Sarukhan et al., 2001b)).

Les caractéristiques de la réponse immunitaire étudiée dans l'étude de Favre et al (Favre et al., 2002) ne soutient pas fortement l'hypothèse d'une transduction directe des CD par le

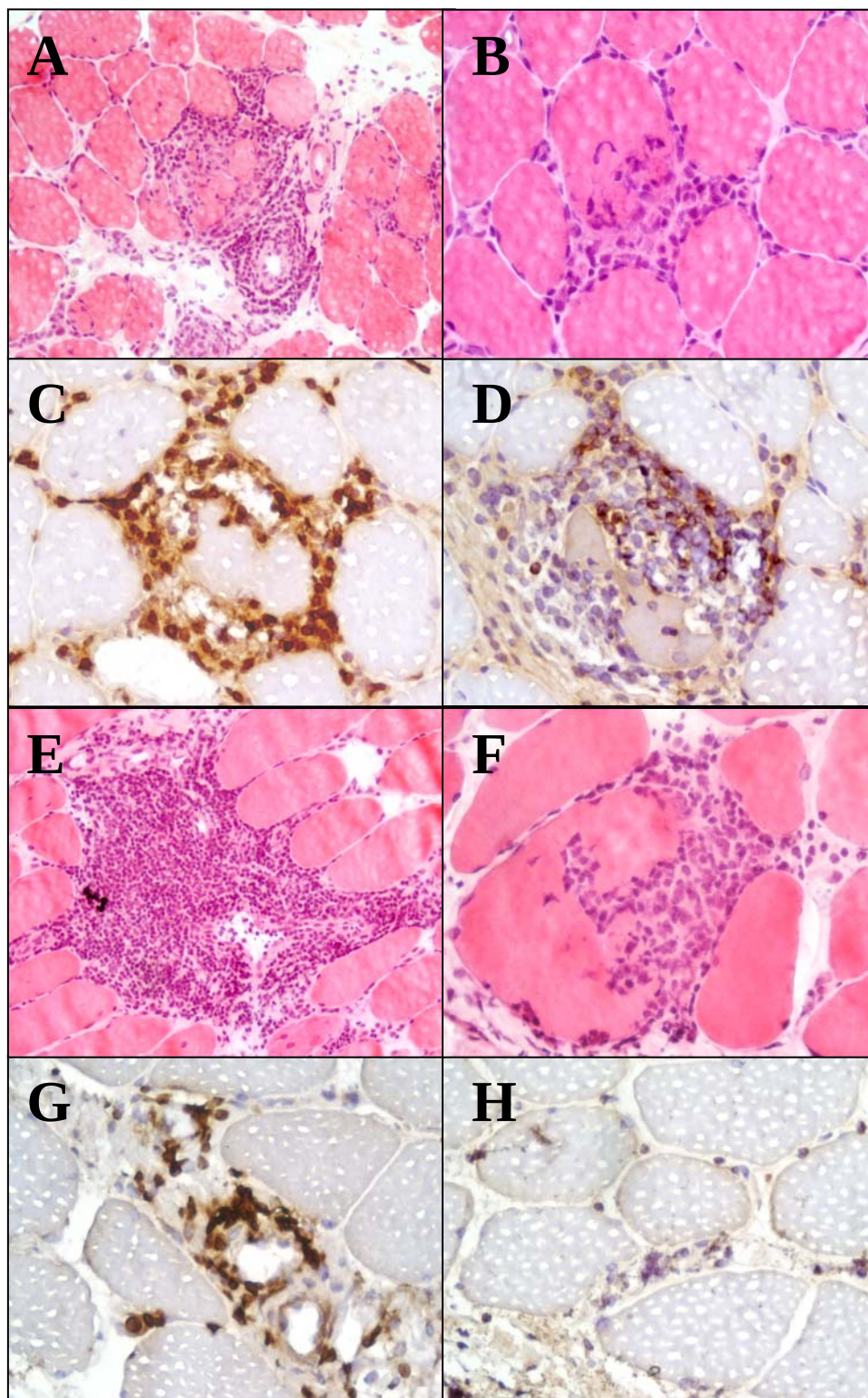
vecteur. La réponse immunitaire était en effet détectée au moins 2 à 3 mois après injection alors que le vecteur circule pendant 3 à 4 jours maximum. Toutefois il fallait étudier cette hypothèse et l'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle paraît un bon outil. Le promoteur dérivé de la desmine humaine (Li and Paulin, 1991)) est spécifique du muscle squelettique chez la souris transgénique (Li et al., 1993). Il faut toutefois noter que nous n'avons pas vérifié l'absence complète d'activité du promoteur Desmine dans les CD de macaque, faute de cassette fonctionnelle.

La plupart des animaux inclus dans notre étude ont présenté une perte de la régulation entre les 3^{ème} et 5^{ème} mois suivant l'injection. Nous n'avons pas étudié les phénomènes immunitaires de façon systématique et détaillée (non publié). Même si notre étude est incomplète et ne concerne pas tous les singes, les résultats obtenus sont en partie identiques à l'étude de Favre et al. Elle montre d'abord la présence d'anticorps dirigés contre le transactivateur 3 à 4 mois après l'injection (détectés en Western blot chez Mac 13 et Mac 14). La présence d'anticorps anti-rtTA chez Mac 13 est d'ailleurs étonnante, puisqu'elle était systématiquement corrélée à la perte d'expression du transgène dans l'étude de David Favre (Favre et al., 2002). La perte de la régulation est corrélée à la détection d'infiltrats inflammatoires lymphocytaires B (CD79) et majoritairement T (CD3) dans les muscles injectés, avec des images de lyse cellulaire chez Mac 14, Mac 15 et Mac 16 (voir Figure 15 « résultats complémentaires, biopsies musculaires des macaques 15 et 16). Nous ne montrons pas que la réponse cellulaire est dirigée spécifiquement contre le transactivateur, mais la chronologie des événements (cinétique d'apparition des anticorps dans le sérum) semblable à l'étude de D.Favre et al suggère que les mécanismes sont les mêmes.

La réponse tardive contre le transactivateur et l'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle sont plutôt en faveur d'une activation des cellules T par cross-présentation. L'initiation de la réponse immune peut dépendre de la nature même de l'organe cible ; il faut souligner que le muscle est particulièrement exposé aux traumatismes et qu'une nécrose ou une lyse cellulaire fortuite peut provoquer la fuite du transactivateur dans le milieu extracellulaire. On peut également concevoir que la fragilisation de la cellule puisse être favorisée par la toxicité du transactivateur, même diminuée pour les nouvelles versions (Urlinger et al., 2000). Il a également été proposé que, dans le cas du facteur IX, la protéine reste bloquée dans la matrice extracellulaire, aboutissant à une surconcentration locale de la protéine exogène qui favoriserait la présentation croisée par les APC (Jooss and Chirmule,

2003), et que ce phénomène ne se produirait pas dans un tissu sécréteur « professionnel » comme le foie. Il a été aussi observé que les interventions chirurgicales faites au niveau du muscle, comme les biopsies, favoriseraient le développement d'anticorps contre le rtTA et la perte de l'expression du transgène (D.Favre, non publié). Favre et al obtenaient en effet un signal positif en ELISPOT IFN- γ chez le seul animal ayant subi une biopsie musculaire un mois après l'injection de vecteurs, et on peut penser que cette biopsie précoce aurait pu amplifier la réponse immune contre le rtTA (Favre et al., 2002). Il faut aussi souligner que cet individu avait reçu la dose la plus forte de vecteurs. Toutefois, dans notre étude, la dose de vecteurs injectée ne semble pas favoriser la réponse immune, puisque, à l'inverse de l'étude de Favre et al, c'est l'animal qui a reçu une des doses les plus fortes (d'AAV-1 de surcroît) qui présente une persistance de la régulation. Le niveau de rtTA exprimé chez les animaux ayant reçu les doses les plus faibles est apparemment suffisant pour initier la réponse immunitaire. La persistance occasionnelle de l'expression du transgène suggère que les mécanismes impliqués dans la reconnaissance de l'antigène pourraient varier selon les individus.

La comparaison des premiers résultats sur primate (Favre et al., 2002) avec ceux obtenus chez la souris (Bohl et al., 1998) (Ginhoux et al., 2004), ainsi que la comparaison des résultats concernant le primate et la souris internes à notre étude montrent qu'après transfert au moyen d'un vecteur AAV, les mécanismes impliqués dans la reconnaissance du rtTA de première ou deuxième génération varient selon l'espèce animale utilisée. Il faut aussi souligner que les versions améliorées du transactivateur (Urlinger et al., 2000) gardent leur pouvoir immunogène dans des modèles proches de l'homme (primate dans notre étude). Les travaux faits par l'équipe de Jean Davoust (Ginhoux et al., 2004) ont permis d'identifier un épitope immunodominant du rtTA de première génération, dont la reconnaissance après électrotransfert dans le muscle entraîne une réponse cytotoxique dans un modèle humanisé de souris HHD. Ce modèle exprime une molécule de classe I du CMH dans laquelle l'extrémité C-terminale de la β 2-microglobuline humaine est liée à l'extrémité N-terminale d'une chaîne lourde chimère (domaines HLA-A*0201 α 1- α 2 et H-2D^b α 3). Le parallèle avec l'étude du groupe de Vincent Thuillier (Latta-Mahieu HGT 2002) souligne la pertinence clinique du modèle utilisé ici puisqu'il avait obtenu une réponse cytotoxique après électrotransfert dans le muscle de primate, alors que Lamartina et al (Lamartina et al., 2002), (Lamartina et al., 2003) obtiennent une expression à long terme (avec des versions plus récentes du rtTA il est vrai).



Résultats complémentaires (1)

Figure 15 : Biopsies musculaires des macaques 15 et 16.

Les biopsies ont été pratiquées au niveau des sites d'injection chez Mac 15 (A, B, C, D) et Mac 16 (E, F, G, H). Les prélèvements ont été réalisés 6 mois après l'injection du vecteur, soit 2 mois après le dernier pic de sécrétion d'Epo pour Mac 15 et 3 mois après le dernier pic pour Mac 16.

A, B, E, F : Coloration à l'hématoxyline et éosine (A et E, grossissement x20 ; B et F, grossissement x40). C, D, G, H : Caractérisation de l'infiltrat sur coupes sériées par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-CD3 (C et G) et anti-CD79 (D et H).

Toutefois, l'expression du transgène persiste dans le modèle de souris HHD après transfert médié par l'AAV, suggérant que le modèle reste tout de même éloigné du modèle primate et que la présentation de l'antigène dans notre étude et celle de Favre et al ferait intervenir d'autres domaines des molécules de classe I du CMH.

L'étude de Ginhoux et al était ambitieuse, car elle proposait d'identifier les épitopes impliqués dans la reconnaissance du rTA et de modifier la protéine en conséquence. Si la suppression de l'épitope dominant par mutagenèse permet d'obtenir un transactivateur fonctionnel, son transfert dans le muscle de souris révèle la présence d'un épitope sous-dominant favorisant également une réponse cellulaire montrée en ELISPOT IFN- γ . Les auteurs soulignent que les épitopes dominant et sous-dominant identifiés se trouvent dans le domaine de liaison aux séquences opératrices TetR, et qu'ils sont retrouvés dans les versions récentes rTA17L (Kamper et al., 2002) ainsi que rTA2^S-S2 et rTA2^S-M2 (Urlinger et al., 2000). Quel est donc l'avenir du système tétracycline, qui utilise ces nouvelles constructions, chez l'homme, et avant tout chez le primate ?

Face à ces résultats, le laboratoire de Jim Wilson utilise le système Rapamycine chez le macaque rhésus et montre une persistance de la régulation sur plus de 5 ans (Rivera, non publié). L'inducteur utilisé est un dérivé de la rapamycine (AP22594), présentant un effet immunosuppresseur moindre chez la souris. Toutefois, son effet immunosuppresseur, favorisant potentiellement la persistance du transgène, n'a pas été évalué chez le primate. Mais ce système paraît très prometteur et semble fournir un bon niveau de régulation, avec une fuite limitée du système en l'absence d'inducteur, même si ce point est mal documenté.

Le développement du système Tétracycline passerait par des protocoles d'immunosuppression ou d'induction de tolérance. Il a déjà été montré que le blocage de la costimulation empêche l'activation des cellules T. Le CTLA4-Ig et l'anti-CD40 ligand, qui bloquent respectivement les interactions B7-CD28 et CD40-CD40 ligand, inhibent la réponse CTL induite par l'adénovirus, permettant une expression prolongée du transgène dans le foie, le poumon et le muscle (Jooss et al., 1998) (Kay et al., 1997). L'administration d'anti-CD40 ligand permet l'expression de transgènes immunogènes (Hémagglutinine) après injection intramusculaire d'AAV (Sarukhan et al., 2001a). Toutefois ces traitements n'induisent pas de tolérance et doivent être poursuivis. L'induction de cellules T régulatrices (CD4⁺ CD25⁺) (pour revue, voir (Vigouroux et al., 2004)) ou leur administration chez l'animal (Gross et al.,

2003) semble particulièrement prometteuse mais limitée à l'heure actuelle aux modèles petits animaux. Après injection d'AAV codant pour l'hémagglutinine, Gross et al (Gross et al., 2003) obtiennent une expression sur 35 jours suite à l'injection de cellules T régulatrices isolées à partir de souris transgéniques TCR-HA. Les animaux ne développent plus de réponse cellulaire détectable en ELISPOT IFN- γ et présentent des taux d'anticorps anti-HA nettement diminués. Toutefois le mode d'isolement ou de production de ces cellules est limité et leur interaction avec les populations lymphocytaires B, CD4 et CD8 est mal connu. Leur utilisation reste toutefois très prometteuse.

Au cours de nos travaux, nous avons fait des observations fortuites de grande importance. Sur les huit macaques utilisés, deux ont présenté une anémie sévère avec apparition d'anticorps dirigés contre l'Epo endogène. Des observations similaires ont été faites dans un autre laboratoire (Jim Wilson, Université de Pennsylvanie, Philadelphie, Etats-Unis) et fait l'objet d'une publication en parallèle de notre article présenté pages suivantes.

Deuxième article

Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy

Pierre Chenuaud, Thibaut Larcher, Joseph E. Rabinowitz, Nathalie Provost, Yan Cherel, Nicole Casadevall, Richard J. Samulski, and Philippe Moullier. 2004. *Blood*. 103(9): 3303-3304.

Brief report

Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy

Pierre Chenuaud, Thibaut Larcher, Joseph E. Rabinowitz, Nathalie Provost, Yan Cherel, Nicole Casadevall, Richard J. Samulski, and Philippe Moullier

We delivered the homologous erythropoietin (Epo) cDNA driven from a doxycycline-regulated promoter via recombinant adeno-associated virus in skeletal muscle of 9 cynomolgus macaques. Upon induction, rapid supraphysiologic levels of Epo were obtained. Unexpectedly, some indi-

viduals developed a profound anemia that correlated with the appearance of neutralizing antibodies against the endogenous Epo. Both the endogenous erythropoietin and vector sequences were identical. This is the first example of the inadvertent development of an autoimmune disease

in primates as a result of gene transfer of a gene expressing a self-antigen. It raises some concerns when a therapeutic protein is produced at high levels from an ectopic site. (Blood. 2004;103:3303-3304)

© 2004 by The American Society of Hematology

Introduction

Phase 1/2 gene therapy trials for hemophilia B patients have exploited the easy access to well-vascularized skeletal muscle for gene transfer via a simple intramuscular injection of recombinant adeno-associated-virus (rAAV) vector to achieve systemic delivery of factor IX, normally synthesized in and secreted from the liver.¹ Erythropoietin (Epo) is another factor that can be secreted from skeletal muscle, instead of the kidney, after gene transfer resulting in phenotypic correction of the β -thalassemic mouse. Indeed, it is generally believed that supraphysiologic doses stimulate the synthesis of fetal β -globin and can partly compensate for deficient adult β -globin synthesis. We, and others, evaluated gene transfer of the Epo cDNA to a variety of ectopic tissues in nonhuman primates using the rapamycin or the doxycycline (Dox)-regulatable system, to allow safe drug-controlled Epo secretion.²⁻⁴ Herein, we show evidence that overexpression of the homologous Epo following rAAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in nonhuman primates can result in severe autoimmune anemia.

Study design

The AAV vector⁵ encoding for the cynomolgus macaque Epo cDNA (cmEpo) under the control of the reverse Dox-dependent transactivator M2⁶ was packaged in serotype-2 (macaque [Mac] 9 through 12), -1 (Mac 13 through 16), and -5 (Mac 17) AAV capsids. Captive-bred cynomolgus macaques received rAAV-1, -2, and -5 vector at the indicated doses (Figure 1B) expressed as vector genome (vg)/kg into the anterior tibialis muscle. Epo induction started 2 months after vector administration and consisted of a 5-day Dox pulse given intravenously and repeated once every month (indicated as "Induction peaks," Figure 1A). Serum Epo was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protocol was approved

by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes, France.

Results and discussion

After 3 to 4 induction cycles, most animals mounted a humoral and cytotoxic T-cell immune response against the Dox-dependent transactivator-expressing cells resulting in the loss of Epo secretion from genetically modified muscles³ (Figure 1A). Animals that secreted less than 100 mU/mL Epo initially had normal hematocrit levels when inductions were discontinued (not shown and see 4 additional macaques in Favre et al³). However, with the exception of Mac 13, both Mac 10 and Mac 14, which exhibited the highest Epo levels (162 and 1159 mU/mL, respectively, at peak 1), exhibited a severe anemia with hematocrit levels of 0.25 (25%) (Figure 2) at the time of necropsy (Mac 10). Mac 14 recovered spontaneously in 4 weeks and remains stable. The mechanism suspected was the development of antibodies against the transgene and endogenous-derived Epo. Sera from anemic individuals precipitated 1.2×10^5 (Mac 10) and 6.7×10^4 (Mac 14) cpm of ¹²⁵I-labeled recombinant human Epo (rhuEpo), whereas sera from the same animals (obtained prior to rAAV administration) or from unaffected animals showed no precipitation. Western blot of rhuEpo showed that the protein was recognized by Mac 10 and Mac 14 sera (not shown). Interestingly, Mac 9, with 100 mU/mL Epo secreted at the initial induction cycle (Figure 1A), raised low levels of anti-Epo antibodies (1.1×10^3 cpm), which likely were not enough to induce anemia (Figure 2). In addition, while the 2 animals were developing anemia, we found cellular infiltrates consisting of macrophages and T/B lymphocytes in

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Nantes, France; University of North Carolina (UNC) Gene Therapy Center, UNC, Chapel Hill, NC; Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France; and Service d'Hématologie Biologique, Paris, France.

Submitted November 12, 2003; accepted December 6, 2003. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, January 22, 2004; DOI 10.1182/blood-2003-11-3845.

Supported by the INSERM and the Association Française contre les Myopathies (AFM).

An Inside *Blood* analysis of this article appears in the front of this issue.

Reprints: Philippe Moullier, INSERM ERM 01-05, CHU Hôtel-Dieu, 44035 Nantes, France; e-mail: moullier@sante.univ-nantes.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2004 by The American Society of Hematology

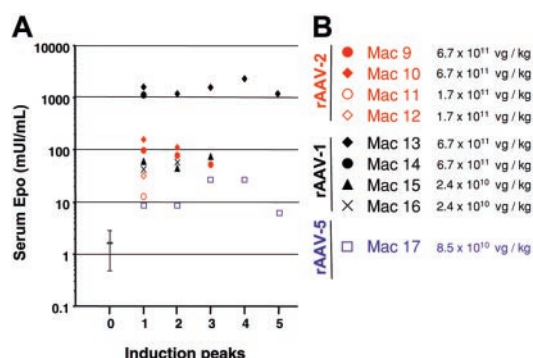


Figure 1. Maximum serum Epo concentration for each Dox induction cycle. (A) Dox-induced Epo secretion measured at the peak level in the serum of Mac 9 through Mac 17 after rAAV-2-mediated (red), rAAV-1-mediated (black), and rAAV-5-mediated (blue) gene transfer. Each induction (referred to as "Induction peaks") lasted 5 days and was repeated every month for 5 months. (B) Amounts of rAAV-2 (red), rAAV-1 (black), and rAAV-5 (blue) vector administered expressed as vector genome/kg determined by dot blot. Mean Epo levels before vector injection are represented by error bars.

the rAAV-injected muscles. Both Mac 10 and Mac 14 endogenous Epo were sequenced and found to be identical to the vector Epo, and the Epo protein secreted from in vitro rAAV-transduced cells had a similar molecular weight as the rhuEpo (not shown).

Gao et al⁷ reports a similar result with rAAV serotype-1, -5, and -8, constitutively expressing homologous Epo cDNA injected in muscle or aerosolized in lung of macaques (see the accompanying article by Gao et al,⁷ beginning on page 3300). The fact that an autoimmune anemia can occasionally arise using 4 different rAAV serotypes (rAAV-1, -2, -5, and -8) in 2 different ectopic organs (skeletal muscle and lung) with respect to normal Epo synthesis and secretion suggests an Epo-specific adverse effect. The partial correlation that we observed between the amount of Epo secreted at peak 1 and the occurrence of anti-Epo antibodies also suggests that posttranslational modifications could take place as previously suggested for highly expressed myotube-derived factor IX,⁸ thus breaking tolerance to self-antigens in an haplotype-dependent manner (see Mac 13 that, despite high levels of Epo synthesis,

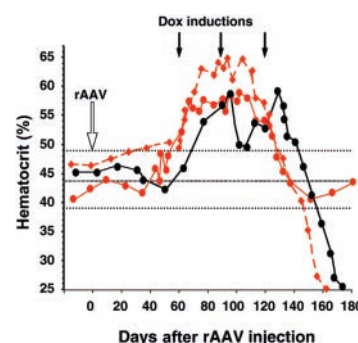


Figure 2. Hematocrit levels from Mac 9 and Mac 10 (red circles and diamonds, respectively), and Mac 14 (black circles) from the time of rAAV-2 (red) and rAAV-1 (black) injections (open arrow), until anemia occurred. Black arrows correspond to the Dox induction cycles. Dotted lines are normal hematocrit levels $\pm$ SD. Symbols in this figure are identical to those in Figure 1.

remained healthy). An aggravating factor could be related to the previously published observation that rAAV serotype-2 spreads efficiently to draining lymph nodes after intramuscular delivery and is associated with long-term peripheral blood monocyte cell transduction.⁵ Whether rAAV serotype-1, -5, and -8 have similar transduction patterns in nonhuman primates after intramuscular administration remains to be determined. In any case, the occurrence of a life-threatening autoimmune response in nonhuman primates following in vivo transfer of a homologous cDNA underscores the need for extensive preclinical studies to understand the mechanism(s) involved, in particular when a therapeutic protein is produced at high levels from an ectopic site.

Acknowledgments

We thank the vector core at the University Hospital of Nantes and supported by the AFM. We also thank Sébastien Küry for sequencing the macaque Epo gene. We thank Joelle Nataf for work detecting anti-Epo antibodies. The authors declare that they have no competing financial interests.

References

- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*. 2000;24:257-261.
- Ye X, Rivera VM, Zoltick P, et al. Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science*. 1999;283:88-91.
- Favre D, Blouin V, Provost N, et al. Lack of immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol*. 2002;76:11605-11611.
- Auricchio A, Rivera V, Clackson T, et al. Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther*. 2002;6:238-242.
- Favre D, Provost N, Blouin V, et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther*. 2001;4:559-566.
- Ullinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:7963-7968.
- Gao G, Lebherz C, Weiner DJ, et al. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood*. 2004;103:3300-3302.
- Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J, et al. Post-translational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood*. 2001;97:130-138.

2.3 Discussion du deuxième article

2.3.1 Transfert du gène de l'Epo et réponse immune

Le développement d'une maladie auto-immune après transfert d'un ADNc codant pour une protéine endogène normalement exprimée constitue une observation originale et de toute première importance en transfert de gène. Elle est d'autant plus sérieuse dans le cas de l'Epo qu'elle induit une maladie grave. Déjà le groupe de J.Leiden (Tripathy et al., 1996) avait obtenu une anémie après transfert de gène de l'Epo dans le muscle de souris au moyen d'un vecteur adénoviral. Toutefois les auteurs ont utilisé deux transgènes, un vecteur codant pour l'Epo murine et l'autre pour l'Epo humaine. Seules les souris ayant reçu le vecteur codant pour l'Epo humaine ont présenté une anémie. Considérant le taux d'homologie entre les deux protéines (79,8 % sur la séquence d'acides aminés (Wen et al., 1993)), l'hypothèse était le développement d'anticorps contre l'Epo humaine cross-réagissant avec l'Epo murine.

Notre observation est confortée par le groupe de Jim Wilson, qui a également montré que la surexpression d'Epo produite après transfert de gène peut induire une anémie auto-immune (Gao et al., 2004a). Ces travaux ont utilisé l'ADNc de l'Epo de macaque rhésus transféré dans le muscle de macaques fascicularis à l'aide d'AAV recombinants de sérotypes 1, 5, 7 et 8 (10^{13} vg/kg) (vg : *vector genome*). Si la littérature montre que les érythropoïétines de macaque et de rhésus sont très proches (98,8 % d'homologie sur la séquence d'acides aminés (Wen et al., 1993)), les auteurs ne montrent aucune différence sur la séquence codante. Le transgène a été placé sous contrôle du promoteur CMV et deux singes ont été utilisés par sérotype. Le deux animaux ayant reçu de l'AAV-5, un animal ayant reçu de l'AAV-1 et un ayant reçu de l'AAV-8 ont présenté une anémie 20 à 80 jours après injection. Il faut remarquer que, contrairement à ce que peut laisser penser notre étude, le développement d'une anémie n'est apparemment pas corrélé aux taux d'Epo sécrétés. Dans cette étude, les quantités d'Epo produites après injection d'AAV-5 sont d'environ 100 mUI/mL, alors qu'elles sont de 10^4 à 10^5 mUI/mL après injection d'AAV-1, 7 ou 8. Des quantités sécrétées aux alentours de 10^4 mUI/mL (environ 100 µg/mL) induisent une réponse immune alors que les taux supérieurs sont apparemment tolérés. Dans notre étude, l'animal ayant présenté une persistance de la régulation avec les pics d'Epo les plus forts (Mac 13, pics d'Epo entre 1200 et 2200 mUI/mL

sur les 5 premières inductions, fig. 1 du deuxième article) n'a pas développé d'anémie. S'agirait-il de variations individuelles ou d'une tolérance en réponse à des fortes doses sécrétées ? Le faible nombre d'animaux utilisés dans les deux études ne permet pas de rendre compte objectivement des variations individuelles. Il faut remarquer que les quantités d'Epo circulantes sont sûrement sous-estimées avec le kit ELISA utilisé (R & D). Le taux basal d'Epo chez l'homme déterminé par cette méthode de dosage est de 4 à 16 mUI/mL, alors qu'il est de 1 à 3 mUI/mL chez le macaque. Considérant que le taux basal doit être proche chez ces deux espèces, les différences obtenues seraient dues à une affinité moindre de l'anticorps primaire monoclonal anti-Epo humaine du kit. Les taux d'Epo sériques seraient donc sous-estimés d'un facteur 4 à 5. Aussi bien dans notre étude que celle du groupe de Jim Wilson, les taux d'Epo ne prennent pas en compte cette correction (Guang-Ping Gao, communication personnelle) et sont donc comparables.

Ce phénomène n'est pas unique au muscle et a été reproduit chez des macaques rhesus après instillation d'AAV-5 et AAV-rh10 par bronchoscopie ($1,5 \cdot 10^{14}$ vg/animal, Gao non publié) ; la diminution des taux d'Epo sécrétés après la deuxième semaine s'est accompagnée d'une chute sévère de l'hématocrite.

A l'inverse, des travaux faits en collaboration entre les équipes de J.Wilson et V.Rivera montrent une expression à long terme d'Epo après transfert dans le muscle de macaques rhesus sans développement d'anémie, quels que soient les taux d'Epo exprimés (Rivera, non publié), après injection de $4 \cdot 10^{12}$ à $2 \cdot 10^{13}$ vg/kg d'AAV-2 et 10^{11} vg/kg d'AAV-1. Dans cette étude, le transgène est placé sous contrôle des promoteurs CMV (suivi sur 6 ans, taux d'Epo compris entre 50 et 150 mUI/mL, AAV-2, $4,8 \cdot 10^{12}$ vg/kg), RSV (suivi sur 4 ans et demi, 2000 à 12000 mUI/mL, AAV-2, $2 \cdot 10^{13}$ vg/kg) ou inductible à la rapamycine (suivi sur 4 à 5,5 ans, 100 à 2000 mUI/mL, AAV-2, 10^{12} à $2 \cdot 10^{13}$ vg/kg).

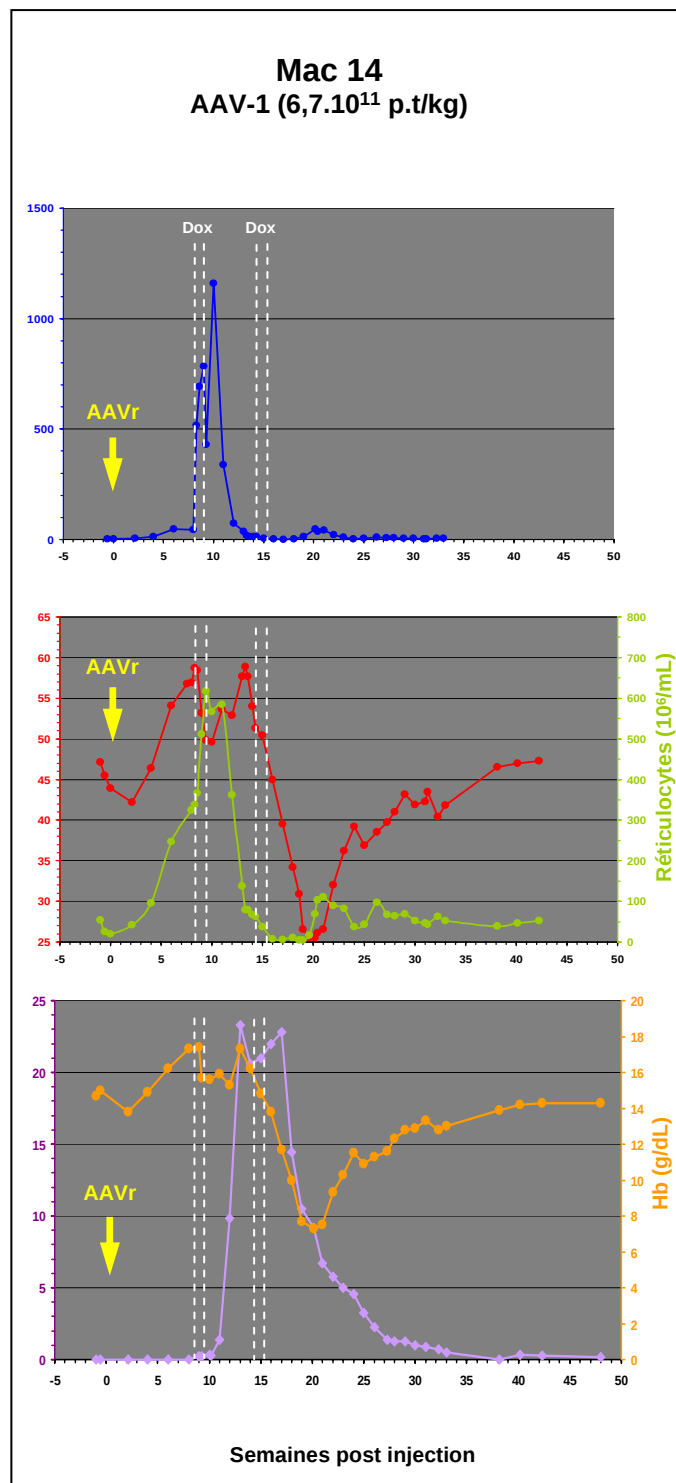
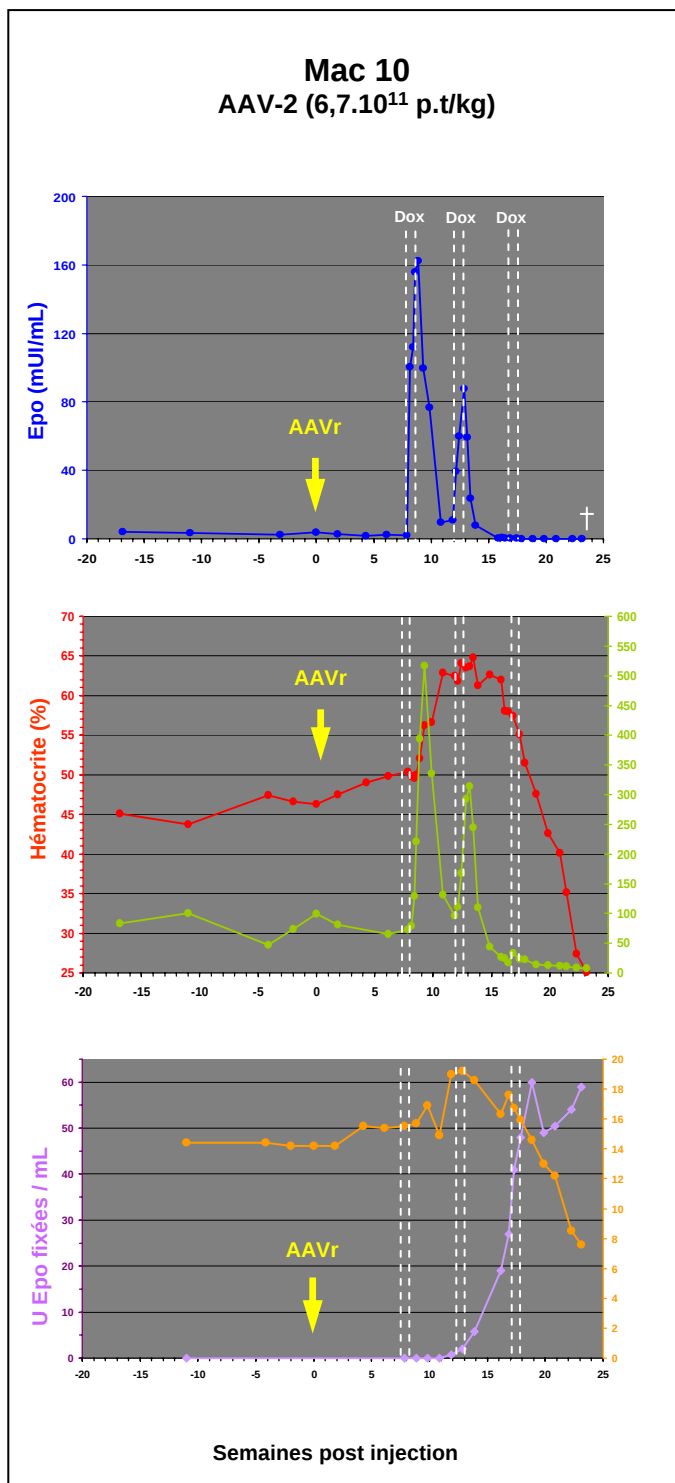
Aussi bien dans notre étude (Chenuaud et al., 2004a) que celle de Gao et al (Gao et al., 2004a), il était essentiel de vérifier l'homologie de la séquence d'ADNc transférée et du gène endogène. Les séquences se sont révélées identiques. Signalons tout de même que la séquence codante identifiée sur biopsies musculaires de Mac 10 et Mac 14 diffère de la séquence de référence GenBank M18189 (Lin et al., 1986). Le séquençage a été fait sur les deux brins. Cette observation concorde avec ce que montrent Gao et al et ce qui avait été préalablement rapporté au laboratoire (D.Favre, E.Payen, non publié). La carte publiée GenBank M18189

présente une inversion en position +47/48 par rapport à l'ATG ; CG remplaçant GC, donnant un résidu Valine au lieu de Leucine (aa -11, (Wen et al., 1993)). L'ancienne carte utilisée au laboratoire était erronée en position +22/23 par rapport à l'ATG ; CG remplaçant GC également, donnant un résidu Arginine au lieu d'un résidu Alanine (aa -20). Il faut remarquer que ces deux mutations sont localisées dans le peptide signal (aa 1 à 27 de l'Epo humaine de 192 aa et 1 à 24 de l'Epo de macaque (Wen et al., 1993)) et qu'elles ne modifieraient en rien la structure de la protéine sécrétée. Surtout, le séquençage intégral du plasmide vecteur montre que la séquence de l'ADNc clonée est conforme au gène endogène des singes anémiques. Même si le séquençage de l'ADN extrait à partir des préparations de vecteurs aurait été judicieux, les résultats obtenus suggèrent fortement que l'ADNc transféré est conforme.

Les animaux ont développé une anémie arégénérative (centrale) : anémie normochrome normocytaire avec un taux de réticulocytes très bas ($< 10 \cdot 10^6/\text{mL}$, en comparaison à un taux normal de $35 \text{ à } 100 \cdot 10^6/\text{mL}$), mimant un défaut de synthèse d'érythropoïétine ou un blocage de l'action de l'Epo sécrétée. De plus les taux d'Epo sériques étaient indétectables chez les animaux atteints. La détection en Western blot d'anticorps dirigés contre l'Epo humaine recombinante et le parallèle avec l'étude de J.Leiden (Tripathy et al., 1996) soutenaient l'hypothèse d'une réponse immune contre la protéine produite par le muscle, avec développement d'anticorps cross-réagissant avec l'Epo endogène.

2.3.2 Cinétique de la réponse humorale dirigée contre l'Epo produite par transfert de gène (résultats complémentaires)

En collaboration avec le groupe de N.Casadevall et P.Mayeux, nous avons déterminé les titres d'anticorps anti-Epo chez les animaux anémiques et sains (Figure 16 page suivante : Suivi des paramètres hématologiques et de la réponse humorale contre l'Epo chez Mac 10 et 14). La technique repose sur la précipitation par la protéine G d'Epo recombinante humaine marquée à l'Iode 125, en présence de serum à tester (Casadevall et al., 2002). La radioactivité du culot est quantifiée en cpm et ramenée à une quantité d'Epo fixée (exprimée en Unités d'Epo fixées par mL de sérum).



Résultats complémentaires (2)

Figure 16 : Suivi des paramètres hématologiques et de la réponse humorale contre l'Epo chez Mac 10 et 14

Suivi des taux d'Epo sérique (en bleu), de l'hématocrite (en rouge), du taux de réticulocytes (en vert), du taux d'hémoglobine (en orange) et du titre d'anticorps anti-Epo (en mauve) chez les macaques anémiques (Mac 10 et 14). Les animaux ont reçu respectivement une injection intra-musculaire (flèche jaune) d'AAV-1 dans le muscle vaste latéral gauche ou d'AAV-2 dans le muscle tibial crânial gauche. Les doses injectées sont indiquées en particules totales par kg. Les titres d'anticorps sont indiqués en unités d'Epo fixées par mL de serum.

Les titres montrent que les anticorps permettent largement de fixer la totalité de l'Epo circulante (60 et 23 U d'Epo fixées par mL, pour des taux respectifs d'Epo sériques de 162 (Mac 10) et 1159 (Mac 14) mUI/mL après la première induction). La quantité d'anticorps détectée n'est pas corrélée au taux d'Epo sérique et reflète une variabilité individuelle. Les titres déterminés dans le serum de Mac 13 sont en dessous du seuil de séropositivité ($<0,2$ U d'Epo fixée/mL), alors que Mac 9 présente un titre faible de 0,24 à 0,4 U d'Epo fixée / mL, sans qu'ils soient apparemment neutralisants ou en quantité suffisante pour déclencher une anémie. Chez les animaux anémiques, les anticorps apparaissent 2 à 4 semaines après la première induction. Ce délai concorde avec ce que rapportent Gao et al puisque dans leur étude les anticorps apparaissent 3 à 9 semaines après injection du vecteur. Compte tenu de la cinétique d'expression du transgène, le délai d'apparition des anticorps serait identique au nôtre, suggérant des mécanismes comparables. Toutefois les titres ne rendent pas compte du pouvoir neutralisant. Gao et al (Gao et al., 2004a) ont par contre montré la présence d'anticorps neutralisants par inhibition de croissance de cellules Epo-dépendantes humaines HCD 57 (+).

Des résultats similaires ont été obtenus chez des patients insuffisants rénaux chroniques traités avec de l'Epo humaine recombinante alpha et bêta (rHuEpo α : *EprexTM*, *ErypoTM* ; rHuEpo β : *NeoRecormonTM*) (Casadevall et al., 2002) (Casadevall, 2002). Il n'y a pas eu pour l'heure de cas déclarés d'anémie suite à un traitement utilisant uniquement de la Darbépoïétine α (AranespTM). (Casadevall, 2003) (Eckardt and Casadevall, 2003). Les patients présentant une réponse immune ont reçu la protéine par voie sous-cutanée alors qu'aucun patient traité exclusivement par voie IV n'a développé d'anticorps. Une fois l'érythroblastopénie chronique déclarée, il n'y a aucune réponse à des doses plus fortes d'Epo et il n'est pas possible de recourir à des formes différentes d'Epo, les anticorps cross-réagissant avec toutes les formes thérapeutiques disponibles (Casadevall, 2003). Des protocoles d'immunosuppression (corticostéroïdes et cyclophosphamide) permettent une disparition des anticorps dans 70 % des cas, alors qu'un arrêt simple d'administration de l'Epo recombinante sans immunosuppression est rarement efficace. La transfusion reste alors le seul moyen de conserver des taux d'hémoglobine physiologiques. Le meilleur traitement semble être la transplantation rénale (Casadevall, 2003). Dans l'étude de Casadevall et al de 2002 (Casadevall et al., 2002), les tests de Scatchard montrent que la population d'anticorps des patients traités avec de l'Epo α est homogène et/ou que les anticorps circulants

reconnaissent un seul épitope sur la protéine. Les anticorps ne reconnaissent pas l'Epo dénaturée, suggérant qu'ils sont dirigés contre des épitopes conformationnels. Les tests d'immunoprécipitation réalisés sur de l'Epo glycosylée et déglycosylée (technique déjà décrite, (Mayeux et al., 1990)) suggèrent qu'ils sont apparemment dirigés contre la partie protéique de la molécule et n'interagissent pas avec les oligosaccharides. Le serum d'un seul patient ayant reçu exclusivement de l'Epo β réagit avec l'Epo native et dénaturée (Casadevall et al., 2002). La fixation des anticorps est même plus forte sur l'Epo déglycosylée, suggérant que les épitopes reconnus sur la partie protéique sont en partie masqués par la partie glucidique imposante de la molécule.

Les tests réalisés dans notre étude montrent également que les titres d'anticorps déterminés sur de l'Epo déglycosylée sont équivalents, voire supérieurs à ceux déterminés avec de l'Epo glycosylée (P.Mayeux, P.Chenuaud, non montré). On pourrait donc penser que la production d'une Epo hypoglycosylée permette la reconnaissance d'épitopes sur la partie protéique de la molécule et entraîne une rupture de tolérance. Il faut également remarquer que cette rupture de tolérance est transitoire pour Mac 14 (Fig. 16) et que cette observation a également été faite pour deux des quatre singes anémiques dans l'étude de Gao et al (Gao et al., 2004a).

Dans le cas des patients traités par l'Epo recombinante, les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien compris. L'incidence des érythroblastopénies chroniques acquises après traitement à l'Epo recombinante a augmenté significativement depuis 1998, la fréquence serait de l'ordre de 20 nouveaux cas pour 100000 patients traités par voie sous-cutanée (Locatelli et al., 2004). Cette augmentation correspondrait à un changement de la formulation des préparations d'Eprex distribuées en Europe (Eckardt and Casadevall, 2003). Les préparations destinées au continent américain n'ont pas été modifiées et l'incidence des complications n'a pas évolué. La séro-albumine humaine (HSA, *human serum albumin*) utilisée comme stabilisant a été remplacée par le polysorbate 80 et la glycine. Certains auteurs pensent que cette formulation serait moins stable et qu'elle favoriserait la formation d'agrégats sous certaines conditions, comme l'exposition prolongée à des températures trop fortes, augmentant l'immunogénicité de la protéine (Eckardt and Casadevall, 2003) (Schellekens and Crommelin, 2003). D'autres pensent que les traces de silicone utilisé comme lubrifiant des seringues prêtes à l'emploi pourrait augmenter l'immunogénicité de la préparation (Eckardt and Casadevall, 2003). Il est maintenant recommandé de restreindre l'usage de l'Eprex au milieu hospitalier ou à des

centres satellites, pour maîtriser les paramètres de conservation des préparations (Locatelli et al., 2004). Il est également recommandé de privilégier la voie IV pour l'érythropoïétine alpha. Depuis peu, la délivrance par voie sous-cutanée est contre-indiquée chez les patients insuffisants rénaux chroniques.

Si la voie d'administration influence la réponse immunitaire contre la protéine, elle influence également la réponse immunitaire après transfert de gène, comme nous avons pu l'exposer auparavant. Les groupes ayant travaillé sur le transfert de l'ADNc du facteur IX dans le muscle ont systématiquement rapporté l'apparition d'anticorps contre la protéine sécrétée chez tout ou partie des animaux (pour revue, voir (Sun et al., 2003)). Il faut toutefois souligner que ces études ne sont pas comparables à la nôtre et celle de Gao et al (Gao et al., 2004a), puisque la protéine exprimée n'est pas présente avant transfert de gène : facteur IX humain chez la souris C57Bl/6 (Herzog et al., 1997) (Ge et al., 2001) (Nathwani et al., 2001), facteur IX murin dans des modèles de souris hémophiles (Fields MolTher 2001), ou facteur IX canin dans des modèles de chiens hémophiles présentant une mutation faux-sens (Herzog et al., 1999) (Herzog et al., 2002) (Arruda et al., 2004) ou non-sens (Herzog et al., 2001). Herzog et al (Herzog et al., 2002) montrent que l'apparition d'anticorps est corrélée à la dose de vecteurs injectée localement et que celle-ci influence le profil de la réponse et la persistance des anticorps. Dans leur étude, seul l'animal ayant reçu la dose locale la plus forte ($1,2 \cdot 10^{13}$ vg/site) présente des anticorps neutralisants sur une durée de 2 ans. Le typage des anticorps montre dans ce cas (et chez les animaux qui présentent des anticorps neutralisants de façon transitoire) la circulation d'IgG1 et d'IgG2. Celles-ci représentent la sous-classe prédominante. Les animaux recevant des doses plus faibles développent des anticorps non neutralisants, détectables sur une période courte de 1 à 8 semaines. Les anticorps circulants sont dans ce cas uniquement de type IgG2 (équivalent des IgG1 murines et IgG4 humaines, réponse Th2). L'animal recevant la dose la plus faible ne développe pas d'anticorps.

A l'inverse, le transfert de l'ADNc du facteur IX dans le foie n'entraîne qu'occasionnellement la développement d'anticorps : facteur IX humain dans le foie de souris C57Bl/6 (Snyder et al., 1997a) (Ge et al., 2001) (Nathwani et al., 2001) et Balb/c (Nathwani et al., 2001), facteur IX humain dans un modèle de souris hémophile (Snyder et al., 1999), facteur IX canin dans un modèle de chien hémophile présentant une mutation non-sens (Mount et al., 2002) ou faux-sens (Snyder et al., 1999). Le transfert de l'ADNc du facteur IX canin sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique (LSP, *Liver Specific Promoter*) par voie

intraportale n'entraîne pas de réponse immune (Wang et al., 2000b). Ces résultats sont d'autant plus intéressants que deux groupes ont obtenu récemment une tolérance après transfert de gène dans le foie, médié par l'AAV-2. Mingozi et al (Mingozi et al., 2003) ont obtenu une tolérance au facteur IX humain chez la souris C3H, Balb/c et C57Bl/6, le transgène étant placé sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique (promoteur de l'alpha-antitrypsine humaine fusionné à l'enhancer de l'apolipoprotéine E). Les animaux ne développent pas de réponse au facteur IX humain injecté par voie sous-cutanée 2 à 3 mois après transfert de gène. De plus, le transfert adoptif des cellules T CD4⁺ spléniques provenant de souris tolérantes inhibe la réponse immunitaire contre la protéine administrée par voie sous-cutanée à des animaux naïfs. Ziegler et al (Ziegler et al., 2004) obtiennent une tolérance à l' α -Galactosidase A humaine dans un modèle murin de maladie de Fabry (maladie de surcharge lysosomale liée à l' α due à un déficit en α -Galactosidase A). L'ADNc transféré dans le foie est placé sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique (DC190). L'apparition d'anticorps en réponse à l'administration de la protéine 6 mois après transfert de gène est inversement proportionnelle à la quantité d' α -Galactosidase sécrétée. Ces résultats ont été reproduits avec de l'AAV-8 (R.Ziegler, non publié).

Si, comme nous l'avons souligné, ces résultats ne sont pas directement comparables aux nôtres car les transgènes ne codent pas pour des protéines circulantes, ils montrent toutefois que la présentation de l'antigène peut varier en fonction de l'organe transduit. La dose, la voie d'injection, la nature du promoteur et les CPA présentes localement sont des variables à considérer. Il n'est pas exclu que dans notre étude la sécrétion par le tissu musculaire favorise l'orientation de la réponse immune et que la présentation de l'antigène serait différente après transduction d'autres organes comme le foie.

A ce stade de l'étude nous pouvions considérer que la surexpression d'érythropoïétine par le muscle, même identique à la protéine endogène, puisse induire à elle seule une réponse immune. Il fallait toutefois prendre en considération les travaux du groupe de K.High (Arruda et al., 2001b) qui montrent que les modifications post-traductionnelles apportées au facteur IX surexprimé *in vitro* varient selon le type cellulaire. Dans cette étude, le profil de glycosylation de la protéine produite par des myocytes n'est pas conforme à celui de la protéine produite par des hépatocytes.

Il fallait donc comparer les formes de l'Epo produite pas transfert de gène et de l'Epo endogène. Nous avons étudié les formes isoélectriques des deux protéines dans le serum d'individus anémiques et sains, en collaboration avec Françoise Lasne (Laboratoire National de Dépistage du Dopage, Châtenay-Malabry, France).

Troisième article

"Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable.

Françoise Lasne, Laurent Martin, Jacques de Ceaurriz, Thibaut Larcher, Philippe Moullier, and Pierre Chenuaud. 2004. *Molecular Therapy*. **10**(4): 409-410.

“Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable

Françoise Lasne,^{1,*} Laurent Martin,¹ Jacques de Ceaurriz,¹ Thibaut Larcher,²
Philippe Moullier,^{2,3,*} and Pierre Chenuaud²

¹National Anti-Doping Laboratory, 92290 Chatenay-Malabry, France

²INSERM U 649, CHU Hotel-Dieu, and

³EFS Pays de Loire, 44035 Nantes, France

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Laboratoire de Therapie Genique, Inserm U649, CHU Hotel-Dieu, Bat. J. Monet, 30 boulevard Jean Monnet, 44035 Nantes, Cedex 01, France

Available online 8 August 2004

Forthcoming “genetic doping” is predicted to be undetectable. In the case of recombinant human erythropoietin (rhEPO), a hormone used in endurance sports, it is being predicted that exogenous drug injections will be replaced by the transfer of the corresponding gene into some of the athlete’s own cells. The hormone thus produced inside the organism is assumed to be completely identical to the physiological one. Our results show that this is not the case and open up optimistic prospects for antidoping control involving gene transfer.

Doping in sport, with very few exceptions, arises from misused medical treatments. This is the case for rhEPO, a hormone that stimulates red blood cell production and that has become a key element of doping in endurance sports. Treatment with rhEPO currently requires repeated injections of recombinant hormones obtained from nonhuman cells, i.e., Chinese hamster ovary (CHO) and baby hamster kidney (BHK) cells, into which the human gene of the hormone has been inserted. Natural endogenous and rhEPO were shown to present different isoelectric profiles, probably the result of altered posttranslational modifications that are species- and tissue type-dependent. This difference has allowed for the development of a test to detect the presence of rhEPO in urine, a test that is currently used in antidoping controls [1].

Genetic technologies are expected to change the very nature of medical treatments. For instance, it is now conceivable that administration of an exogenous therapeutic protein will be replaced by introducing the corresponding gene into some of the patient’s own cells. It is almost inevitable that athletes will exploit such medical progress in an effort to elude detection by sport authorities charged with curbing doping practices. Doping practices, in addition to being the focus of regulatory issues, may also severally and

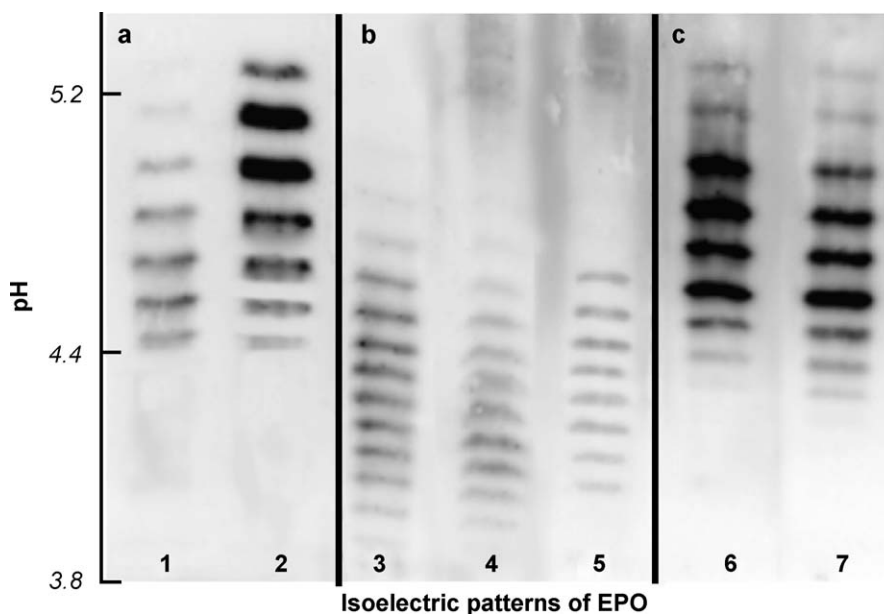
adversely affect the health of athletes that engage in such practices. Doping by gene transfer may compound these adverse side effects because of direct toxic effects, persistent gene expression, or potential insertional mutagenesis [2,3]. Furthermore, the assumption that these new methods of doping will yield proteins that are identical to the endogenous gene product, thus making detection impossible, may not be the case.

To compare the isoelectric profiles of physiological EPO and hormone resulting from *in vivo* gene transfer, we have adapted for serum analysis a method previously developed for urine [4]. Using this method, samples from cynomolgus macaques were analyzed for the serum recombinant EPO profile before and after transfer of the homologous cDNA into skeletal muscle by injection of recombinant adeno-associated virus [5]. Transgene expression was controlled by a doxycycline-regulatable system [6].

The physiological isoforms of the simian hormone were very similar to those of human urine EPO (Fig. 1b). Induction of transgene expression in these macaques resulted in overexpression of a hormone presenting a pattern strikingly different from that of the endogenous isoforms (Fig. 1c). The transgene-derived isoforms resolved with isoelectric focusing at higher pH, a finding more characteristic of recombinant EPO than endogenous EPO (Fig. 1a). In primates, EPO is primarily synthesized by renal peritubular fibroblasts [7]. The distinctive isoelectric pattern of recombinant EPO produced by skeletal muscle emphasizes the importance of cell type on the characteristics of recombinant EPO.

It is noteworthy that the structural features responsible for the described differences between the isoelectric patterns of physiological human urinary EPO and those of recombinant hormone are not yet clarified [4]. The newly observed differences in the macaque serum

Fig. 1. Isoelectric patterns of erythropoietin. (a) rhEPO from CHO cells (lane 1) and BHK cells (lane 2). (b) Physiological EPO from human urine (lane 3) and macaque serum (lanes 4 and 5). (c) EPO from macaque serum after gene transfer in skeletal muscle (lanes 6 and 7). Serum samples (5) and (6) are from the same animal before and after gene transfer, respectively. Specific detection of EPO was obtained by double-blotting following isoelectric focusing. Cathode is at the top.



between the pattern of physiological EPO and that from transduced muscle are every bit as striking and require further study. Because a previous report [8] indicated that EPO extracted from serum was not as different in isoform distribution from recombinant EPO as was urinary EPO, the difference that we report here between the endogenous and the transgene-derived product from the serum samples is even more relevant. However, because the current test for rhEPO in sport uses urine, our study will have to be extended to this biological fluid.

The biological effects of recombinant EPO from genetically engineered muscle have been demonstrated in animal models [9,10]. However, our observations indicate that this recombinant EPO, like the other sources of rhEPO, is not identical to the physiological hormone. Skeletal muscle, since it is an easily accessible and efficiently transduced tissue, is likely to be the target tissue of choice for genetic doping. Although other methods of gene transfer exist and may be exploited for gene doping, and such methods are yet to be investigated, our results provide encouraging evidence that doping by gene transfer will likely not go undetected at least when skeletal muscle is the target.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. N. Matthew Ellinwood for helpful reading and editing of the manuscript.

RECEIVED FOR PUBLICATION JUNE 23, 2004; ACCEPTED JULY 20, 2004.

REFERENCES

1. Lasne, F., and de Ceaurrez, J. (2000). Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* **405**: 635.
2. Lippi, G., and Guidi, G. (2003). New scenarios in antidoping research. *Clin. Chem.* **49**: 2106–2107.
3. McCrory, P. (2003). Super athletes or gene cheats? *Br. J. Sports Med.* **37**: 192–193.
4. Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., and de Ceaurrez, J. (2002). Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal. Biochem.* **311**: 119–126.
5. Chenuaud, P., et al. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**: 3303–3304 [Published online January 22, 2004].
6. Chenuaud, P., et al. (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* **9**: 410–418.
7. Fisher, J. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* **288**: 1–14.
8. Skibeli, V., Nissen-Lie, G., and Torjesen, P. (2001). Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* **98**: 3626–3634.
9. Samakoglu, S., Bohl, D., and Heard, J. M. (2002). Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. *Mol. Ther.* **6**: 793–803.
10. Johnston, J., Tazelaar, J., Rivera, V., Clackson, T., Gao, G., and Wilson, J. (2003). Regulated expression of erythropoietin from an AAV vector safely improves the anemia of β -thalassemia in a mouse model. *Mol. Ther.* **7**: 493–497.

2.4 Discussion du troisième article

Le message de cet article est double et intéresse deux disciplines scientifiques apparemment sans rapport. Sans vouloir nous éloigner de notre sujet, il est important de s'intéresser succinctement au dopage par transfert de gène.

2.4.1 Dopage génétique

L'utilisation de l'érythropoïétine recombinante est interdite depuis 1989 chez les sportifs en compétition. Cependant la technique développée par Lasne et al (Lasne and de Ceaurriz, 2000) permettant la détection de l'Epo recombinante dans l'urine n'est utilisée dans les tests antidopages que depuis le début des années 2000. Elle repose sur le fait que l'Epo recombinante α et β présente des formes isoélectriques plus basiques que l'Epo endogène urinaire et qu'elle est détectable après une prise unique ou une administration prolongée (Lasne et al., 2002). L'*isoelectric focusing* permet de séparer des molécules selon leur charge dans un gradient de pH. La technique est mise en œuvre après concentration par ultrafiltration sur membrane de 30kDa puis inactivation des protéases urinaires par chauffage. La spécificité est améliorée par une phase de double blot avant l'incubation par l'anticorps secondaire, permettant de ne transférer que l'anticorps primaire sur une seconde membrane et d'éviter toute hybridation non spécifique de l'anticorps secondaire. La technique développée pour le serum fait appel à une étape de purification (F.Lasne, non publié).

La pratique du dopage génétique est interdite depuis 2003. Il se définit comme l'usage non thérapeutique de gènes, d'éléments génétiques et/ou de cellules qui ont la capacité d'améliorer la performance sportive. Le muscle est un organe particulièrement facile d'accès et l'injection intramusculaire un acte anodin. Le tissu musculaire serait donc la cible première du dopage par transfert de gène, d'autant plus qu'il peut être transduit efficacement par les vecteurs viraux utilisés à l'heure actuelle (AAV-1 notamment) ou l'ADN nu transféré par choc électrique. Cette dernière possibilité paraîtrait la plus envisageable, l'ADN plasmidique est un matériel facile à produire et à amplifier. La collaboration avec Françoise Lasne montre

que le dopage à l'érythropoïétine par transfert de gène dans le muscle est détectable, mais serait-ce également le cas pour d'autres protéines sécrétées ? De plus, le dépistage de facteurs non sécrétés, permettant par exemple une transformation cellulaire (Wang et al., 2004) serait moins aisé car il ferait appel à une biopsie pour mettre en évidence l'ADNc transféré (PCR spécifique de l'ADNc ou PCR quantitative dans le cas d'un gène déjà présent). Le débat reste ouvert.

2.4.2 Analyse par Isoelectric focusing des formes sériques de l'Epo endogène et de l'Epo produite par transfert de gène

L'analyse des profils de migration en IEF (*Isoelectric focusing*) des protéines endogène et recombinante montre que l'Epo produite par transfert de gène diffère de la protéine endogène. Les pistes 6 et 7 (fig.1 du 3^{ème} article) figurent les profils isoélectriques de l'Epo circulante des macaques 13 et 14 respectivement (voir fig.1 du 2^{ème} article et table 1 du 1^{er} article). Les prélèvements correspondent au pic de sécrétion de la première induction. Les pistes 4 et 5 représentent respectivement les serums pré-injection des macaques 11 et 13. Seul le macaque 14 a développé une anémie. Les formes isoélectriques de l'Epo produite par transfert de gène sont comparables chez Mac 13 et 14 et proches de l'Epo recombinante produite in vitro.

L'étude d'Arruda et al (Arruda et al., 2001b) suggère que le type cellulaire influe sur le profil des modifications post-traductionnelles du facteur IX, et de glycosylation en particulier. L'extension de ces conclusions au cas de l'érythropoïétine serait d'autant plus importante que la glycosylation représente une part importante de la molécule (Davis et al., 1987). La protéine présente trois sites de N-glycosylation (résidus Asn 24, 38 et 83) et un site de O-glycosylation (résidu Ser 126), impliqués dans la sécrétion, la demi-vie et l'activité de la molécule (pour revue, voir (Krantz, 1991)). Les oligosaccharides liés par une liaison N-glycosidique aux résidus Asn sont constitués de dimères de résidus N-Acétylglucosamine, fusionnés à un résidu mannose, à partir duquel se ramifie deux, trois ou quatre branches de répétitions N-Acétylglucosamine/Galactose, par l'intermédiaire de deux résidus mannose. La nature des oligosaccharides est donc variée : bi, tri ou tétraantennés. Des acides N-acétylneuraminique (acide sialique) sont liés à l'extrémité des « antennes » au résidu

Galactose terminal en liaison α 1-4 (Sasaki et al., 1987). L'Epo recombinante produite sur cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cells*) comprendrait majoritairement des oligosaccharides tétraantennés (Sasaki et al., 1987). Les oligosaccharides O-liés présentent une à deux ramifications et portent entre 0 et 2 acides sialiques (Egrie and Browne, 2001). L'érythropoïétine présente donc des isoformes comprenant au maximum 14 acides sialiques. La charge de la molécule est due en grande partie à ces acides (Storring and Yuen, 2003) et la diversité des formes isoélectriques de la protéine recombinante est à relier en partie à leur nombre variable par molécule. Une protéine analogue de l'Epo (Darbepoietin α)(NESP, *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein, AranespTM*) présente deux résidus Asn supplémentaires, par substitution de 5 acides aminés (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn et Pro90Thr), portant le nombre d'acides sialiques maximal à 22. En accord avec cette caractéristique, cette protéine présente des pI (points isoélectriques) plus acides que l'Epo α et β produites sur CHO (Lasne et al., 2002).

Une étude de Skibeli et al suggère que l'Epo sérique humaine ne comporte pas de glucides tétraantennés (Skibeli et al., 2001). Les différentes formes d'Epo recombinantes présentent une proportion de groupements tétraantennés de 20% (Epo α et ω) à 46% (Epo β). Les formes d'Epo recombinantes sont donc hypersyalilées. Cette étude a été critiquée injustement (Storring and Yuen, 2003) ; la critique portait sur de possibles biais induits par le procédé d'extraction de l'Epo sérique. Cette observation ne concorde pas avec les études précédentes (Lasne and de Ceaurriz, 2000) et la nôtre, qui montrent que les pI de l'Epo urinaires sont plus acides que l'Epo recombinante. Toutefois la comparaison des Epo urinaire et sérique n'a pas été faite dans notre étude ; les études précédentes montrent que l'Epo urinaire migre à des pH plus acides que son homologue sérique (Tam et al., 1991).

Il n'est donc pas possible d'interpréter totalement les différences des profils isoélectriques par la distribution des acides sialiques et donc, globalement, de la glycosylation. On ne peut donc pas préciser en quels points diffèrent l'Epo endogène de l'Epo produite par le muscle. Il faut considérer que d'autres modifications post-traductionnelles, comme les sulfatations (Kawasaki et al., 2001), peuvent intervenir. La coupure du peptide signal et la délétion du résidu basique C-terminal Arg (Recny et al., 1987) sont également des points non étudiés. L'électrophorèse en deux dimensions permettrait de vérifier en parallèle le poids de la protéine.

De façon étonnante, l'Epo produite après transfert de gène dans la rétine de primate (médiée par l'AAV-4) présente le même profil de pI que l'Epo endogène (F.Lasne, F.Rolling, non publié). Il faut remarquer que l'Epo et son récepteur sont exprimés physiologiquement dans la rétine d'animaux adultes (Gassmann et al., 2003). L'Epo est exprimée également dans la moelle épinière, les testicules, le cerveau (Gassmann et al., 2003), où elle aurait un rôle de neuroprotection (Maurer et al., 2002) (Bahlmann et al., 2004). Le foie est l'organe de production de l'Epo fœtale et le siège d'une synthèse d'Epo extra-rénale chez l'homme (Krantz, 1991), faisant intervenir majoritairement les hépatocytes (Koury et al., 1991). Faudrait-il en conclure, qu'après transfert de gène, l'Epo produite par un organe normalement sécréteur serait homologue à la protéine endogène, comme le suggère les travaux de Arruda et al (Arruda et al., 2001b) pour le facteur IX ? Il serait très intéressant d'étudier le profil de migration de l'Epo produite après transfert de gène hépatique.

La publication de nos résultats en parallèle de ceux de Gao et al (Gao et al., 2004a) a suscité des réactions dans le milieu scientifique (Flotte, 2004b). L'utilisation du muscle comme organe sécréteur d'Epo est donc largement remise en cause. Il faudrait toutefois déterminer si le profil de migration en IEF est le même quelle que soit la quantité de protéine produite (suivi à faire au cours d'une induction par exemple), pour préciser qui de la production même par le muscle et/ou de la surexpression est déterminante. De plus il n'est pas clair si ce phénomène est propre à l'Epo ; il faudrait pouvoir généraliser cette observation à d'autres transgènes.

3. Conclusion générale

Le premier objectif que nous nous étions fixés dans cette thèse était d'évaluer de nouvelles constructions du système de régulation Tet-On chez la souris puis le primate. Notre étude montre que les caractéristiques du système de régulation ont été améliorées et que ceci est la composante des différents changements apportés à la construction finale (promoteur desmine plus faible que le promoteur CAG, orientation des cassettes afin de diminuer l'interférence entre les promoteurs, version optimisée du transactivateur). Le système permet un niveau d'induction de près de 50, sans fuite détectable du transgène, et c'est une avancée par rapport à l'ancienne construction utilisée (Favre et al., 2002). L'efficacité de la régulation est même comparable à un système faisant appel au tTS et au rtTA2^S-M2 placé sous contrôle du promoteur CMV, également évalué chez le primate (Lamartina et al., 2003). Toutefois lorsque les doses de vecteurs injectées sont plus élevées, l'expression du transgène n'est pas complètement verrouillée. L'utilisation de systèmes dérivés du Tet-KRAB pourrait diminuer la fuite en l'absence d'inducteur, mais il n'est pas certain que le niveau d'expression en induction soit conservé. Sans domaine d'activation de la transcription, le niveau d'expression du transgène dépend du promoteur CMV cloné en aval des séquences Tet-O. De plus, l'immunogénicité du rtTA reste un problème dans le modèle pré-clinique primate, malgré l'utilisation d'un promoteur tissu-spécifique et d'une version du transactivateur largement délétée dans le domaine VP16. Il faut souligner les travaux récents de Ginhoux et al (Ginhoux et al., 2004) qui montrent que, chez la souris HHD, les épitopes reconnus sont localisés dans la partie bactérienne du transactivateur. L'extension de ces travaux au tTS seul et au rtTA2^S-M2 serait particulièrement intéressante. Des protocoles d'immunosuppression non spécifique (CTLA4Ig, anti CD40 ligand) ou l'induction d'une tolérance vis-à-vis des épitopes identifiés sont des voies à explorer. Le développement d'autres modèles murins permettant d'étudier la réponse immunitaire contre le transactivateur seraient également un outil précieux.

Le groupe de K.High a montré récemment l'apparition d'une réponse cellulaire contre la capside de l'AAV-2 après transfert dans le foie, dans le cadre d'un essai clinique sur des patients hémophiles. Cette observation est d'autant plus importante qu'auparavant aucun essai préclinique n'avait mentionné de réponse cellulaire contre le vecteur. Toutefois il faut garder à l'esprit que cette complication n'a concerné qu'un seul patient, et même si les mécanismes mis en jeu sont pas élucidés, il faut considérer que l'AAV est un vecteur très bien toléré. Le

groupe de Jim Wilson a montré récemment (M.Rivera, 7^{ème} congrès annuel de la Société Américaine de Thérapie Génique (ASGT), Minneapolis, Etats-Unis) qu'un vecteur AAV-2 injecté dans un muscle de macaques rhesus persistait pendant au moins 6 ans. De nouveaux clones d'AAV sont évalués à l'heure actuelle en tant que vecteurs. Il faut souligner l'importance des études de dissémination lors du développement de vecteurs dans des modèles grands animaux, et considérer l'importance du modèle primate dans ce cadre. Notre premier article (Chenuaud et al., 2004b) constitue la première publication d'utilisation de l'AAV-1 chez le primate. Cette évaluation s'est accompagnée d'une étude de dissémination (Y.Cariou, travaux en cours). Si l'étude de la dissémination des vecteurs dans les organes, les gonades et les fluides biologiques est une étude importante dans le cadre de la sécurité virale (détection du transgène en PCR ou quantification des particules infectieuses dans le serum), il faut également considérer l'étude de la dissémination dans les PBMC et les noeuds lymphatiques, en rapport avec l'étude des phénomènes immunitaires. Si la transduction des cellules dendritiques murines et humaines par l'AAV-2 a été étudiée, on ne connaît pas le pouvoir de transduction des autres sérotypes, et notamment du sérotype 1, sur ces cellules.

Le développement d'une anémie auto-immune remet en cause l'utilisation du muscle comme organe sécréteur d'érythropoïétine, en tant que gène thérapeutique. Il faut souligner que nous ne l'utilisons pas en tant que tel et qu'il est inséré dans les vecteurs en tant que gène rapporteur. Cette observation nécessite des travaux supplémentaires, puisqu'on ne sait pas si ce phénomène est propre à l'Epo. Nous avons montré que les formes d'Epo sécrétées par le muscle étaient différentes de l'Epo endogène, même s'il est difficile de préciser en quoi les molécules diffèrent. On ne peut pas exclure que la réponse immune soit favorisée par les CPA présentes localement, et il faudrait considérer l'importance de l'organe sécréteur aussi bien sur la forme de la protéine produite (la rétine, organe normalement sécréteur d'Epo, produit apparemment une protéine normale après transfert de gène) que l'orientation de la réponse immunitaire. Il serait à ce titre extrêmement intéressant d'étudier les formes d'Epo produites par le foie après transfert de gène (par IEF ou électrophorèse en deux dimensions) et de préciser si la surexpression induit les mêmes phénomènes.

Les applications du transfert de gène utilisant l'AAVr sont une suite de cas particuliers, où beaucoup de variables apparaissent, si bien qu'il est très difficile de généraliser : sérotype utilisé, nature et niveau d'expression du transgène, force et spécificité tissulaire du promoteur, voie et mode d'administration, conditions de préparation et de purification des préparations

virales, modèle animal utilisé, variabilité individuelle dans les modèles gros animaux et l'homme. L'AAV recombinant a été testé avec succès dans de nombreux protocoles pré-cliniques et cliniques dans le foie, le muscle, le poumon (175 patients atteints de mucoviscidose ont reçu de l'AAV-CFTR, sans qu'aucun effet secondaire sérieux soit relié au vecteur (Flotte, 2004b)) et il reste à l'heure actuelle un vecteur prometteur en transfert de gène.

4. Références bibliographiques

- Abadie, J., Blouin, V., Guigand, L., Wyers, M. and Cherel, Y. (2002) Recombinant adeno-associated virus type 2 mediates highly efficient gene transfer in regenerating rat skeletal muscle. *Gene Ther*, **9**, 1037-1043.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., Hauswirth, W.W. and Bennett, J. (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*, **28**, 92-95.
- Aguirre, G.D., Baldwin, V., Pearce-Kelling, S., Narfstrom, K., Ray, K. and Acland, G.M. (1998) Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis*, **4**, 23.
- Aitken, M.L., Moss, R.B., Waltz, D.A., Dovey, M.E., Tonelli, M.R., McNamara, S.C., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Carter, B.J. and Reynolds, T.C. (2001) A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther*, **12**, 1907-1916.
- Ali, R.R., Sarra, G.M., Stephens, C., Alwis, M.D., Bainbridge, J.W., Munro, P.M., Fauser, S., Reichel, M.B., Kinnon, C., Hunt, D.M., Bhattacharya, S.S. and Thrasher, A.J. (2000) Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet*, **25**, 306-310.
- Al-Khatti, A., Veith, R.W., Papayannopoulou, T., Fritsch, E.F., Goldwasser, E. and Stamatoyannopoulos, G. (1987) Stimulation of fetal hemoglobin synthesis by erythropoietin in baboons. *N Engl J Med*, **317**, 415-420.
- Allen, J.M., Debelak, D.J., Reynolds, T.C. and Miller, A.D. (1997) Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol*, **71**, 6816-6822.
- Apparailly, F., Millet, V., Noel, D., Jacquet, C., Sany, J. and Jorgensen, C. (2002) Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis. *Hum Gene Ther*, **13**, 1179-1188.
- Arruda, V.R., Fields, P.A., Milner, R., Wainwright, L., De Miguel, M.P., Donovan, P.J., Herzog, R.W., Nichols, T.C., Biegel, J.A., Razavi, M., Dake, M., Huff, D., Flake, A.W., Couto, L., Kay, M.A. and High, K.A. (2001a) Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther*, **4**, 586-592.
- Arruda, V.R., Hagstrom, J.N., Deitch, J., Heiman-Patterson, T., Camire, R.M., Chu, K., Fields, P.A., Herzog, R.W., Couto, L.B., Larson, P.J. and High, K.A. (2001b) Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood*, **97**, 130-138.

- Arruda, V.R., Schuettrumpf, J., Herzog, R.W., Nichols, T.C., Robinson, N., Lotfi, Y., Mingozzi, F., Xiao, W., Couto, L.B. and High, K.A. (2004) Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood*, **103**, 85-92.
- Atchison, R.W., Casto, B.C. and Hammon, W.M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science*, **149**, 754-756.
- Auricchio, A., O'Connor, E., Hildinger, M. and Wilson, J.M. (2001) A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther*, **4**, 372-374.
- Auricchio, A., Rivera, V.M., Clackson, T., O'Connor, E.E., Maguire, A.M., Tolentino, M.J., Bennett, J. and Wilson, J.M. (2002) Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther*, **6**, 238-242.
- Bahlmann, F.H., de Groot, K., Haller, H. and Fliser, D. (2004) Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrol Dial Transplant*, **19**, 20-22.
- Bainbridge, J.W., Mistry, A., Binley, K., De Alwis, M., Thrasher, A.J., Naylor, S. and Ali, R.R. (2003) Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization. *Gene Ther*, **10**, 1049-1054.
- Bainbridge, J.W., Mistry, A., De Alwis, M., Paleolog, E., Baker, A., Thrasher, A.J. and Ali, R.R. (2002) Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther*, **9**, 320-326.
- Bantel-Schaal, U., Delius, H., Schmidt, R. and zur Hausen, H. (1999) Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses. *J Virol*, **73**, 939-947.
- Bantel-Schaal, U. and zur Hausen, H. (1984) Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology*, **134**, 52-63.
- Baron, U., Gossen, M. and Bujard, H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2723-2729.
- Bartlett, J.S., Kleinschmidt, J., Boucher, R.C. and Samulski, R.J. (1999) Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol*, **17**, 181-186.
- Bartlett, J.S., Samulski, R.J. and McCown, T.J. (1998) Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum Gene Ther*, **9**, 1181-1186.
- Bartlett, J.S., Wilcher, R. and Samulski, R.J. (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*, **74**, 2777-2785.
- Beall, C.J., Phipps, A.J., Mathes, L.E., Stromberg, P. and Johnson, P.R. (2000) Transfer of the feline erythropoietin gene to cats using a recombinant adeno-associated virus vector. *Gene Ther*, **7**, 534-539.

- Berns, K. (1996). Parvoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, pp. 2173-2197. Edited by N. B. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley & e. al. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Bevan, M.J. (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*, **143**, 1283-1288.
- Blouin, V., Brument, N., Toubanc, E., Raimbaud, I., Moullier, P. and Salvetti, A. (2004) Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process. *J Gene Med*, **6**, S223-228.
- Bohl, D., Bosch, A., Cardona, A., Salvetti, A. and Heard, J.M. (2000) Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle. *Blood*, **95**, 2793-2798.
- Bohl, D., Naffakh, N. and Heard, J.M. (1997) Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med*, **3**, 299-305.
- Bohl, D., Salvetti, A., Moullier, P. and Heard, J.M. (1998) Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood*, **92**, 1512-1517.
- Brown, B.D. and Lillicrap, D. (2002) Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood*, **100**, 1133-1140.
- Brument, N., Morenweiser, R., Blouin, V., Toubanc, E., Raimbaud, I., Cherel, Y., Folliot, S., Gaden, F., Boulanger, P., Kroner-Lux, G., Moullier, P., Rolling, F. and Salvetti, A. (2002) A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther*, **6**, 678-686.
- Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F. and Heath, W.R. (1998) Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today*, **19**, 368-373.
- Casadevall, N. (2002) Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol Dial Transplant*, **5**, 42-47.
- Casadevall, N. (2003) Pure red cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with epoetin. *Nephrol Dial Transplant*, **18**, viii37-41.
- Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., Kolta, A., Kiladjian, J.J., Martin-Dupont, P., Michaud, P., Papo, T., Ugo, V., Teyssandier, I., Varet, B. and Mayeux, P. (2002) Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med*, **346**, 469-475.
- Cathomen, T., Stracker, T.H., Gilbert, L.B. and Weitzman, M.D. (2001) A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14991-14996.

- Chadeuf, G., Favre, D., Tessier, J., Provost, N., Nony, P., Kleinschmidt, J., Moullier, P. and Salvetti, A. (2000) Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med*, **2**, 260-268.
- Chang, L.S. and Shenk, T. (1990) The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J Virol*, **64**, 2103-2109.
- Chang, L.S., Shi, Y. and Shenk, T. (1989) Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol*, **63**, 3479-3488.
- Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R.J. and Walsh, C.E. (2000) Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther*, **2**, 619-623.
- Chao, H., Monahan, P.E., Liu, Y., Samulski, R.J. and Walsh, C.E. (2001) Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther*, **4**, 217-222.
- Chen, S.J., Tazelaar, J. and Wilson, J.M. (2001) Selective repopulation of normal mouse liver by hepatocytes transduced in vivo with recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, **12**, 45-50.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J.E., Provost, N., Cherel, Y., Casadevall, N., Samulski, R.J. and Moullier, P. (2004a) Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood*, **103**, 3303-3304.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J.E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R.J., Favre, D. and Moullier, P. (2004b) Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther*, **9**, 410-418.
- Chiorini, J.A., Kim, F., Yang, L. and Kotin, R.M. (1999) Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J Virol*, **73**, 1309-1319.
- Chiriva-Internati, M., Liu, Y., Weidanz, J.A., Grizzi, F., You, H., Zhou, W., Bumm, K., Barlogie, B., Mehta, J.L. and Hermonat, P.L. (2003) Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood*, **102**, 3100-3107.
- Chirmule, N., Propert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R. and Wilson, J. (1999) Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*, **6**, 1574-1583.
- Chirmule, N., Xiao, W., Truneh, A., Schnell, M.A., Hughes, J.V., Zoltick, P. and Wilson, J.M. (2000) Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol*, **74**, 2420-2425.
- Clackson, T. (2000) Regulated gene expression systems. *Gene Ther*, **7**, 120-125.

- Clark, K.R., Liu, X., McGrath, J.P. and Johnson, P.R. (1999) Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther*, **10**, 1031-1039.
- Clark, K.R., Sferra, T.J. and Johnson, P.R. (1997) Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther*, **8**, 659-669.
- Conrad, C.K., Allen, S.S., Afione, S.A., Reynolds, T.C., Beck, S.E., Fee-Maki, M., Barraza-Ortiz, X., Adams, R., Askin, F.B., Carter, B.J., Guggino, W.B. and Flotte, T.R. (1996) Safety of single-dose administration of an adeno-associated virus (AAV)-CFTR vector in the primate lung. *Gene Ther*, **3**, 658-668.
- Cordier, L., Gao, G.P., Hack, A.A., McNally, E.M., Wilson, J.M., Chirmule, N. and Sweeney, H.L. (2001) Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther*, **12**, 205-215.
- Cordier, L., Hack, A.A., Scott, M.O., Barton-Davis, E.R., Gao, G., Wilson, J.M., McNally, E.M. and Sweeney, H.L. (2000) Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Mol Ther*, **1**, 119-129.
- Daly, T.M., Ohlemiller, K.K., Roberts, M.S., Vogler, C.A. and Sands, M.S. (2001) Prevention of systemic clinical disease in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene transfer. *Gene Ther*, **8**, 1291-1298.
- Daly, T.M., Vogler, C., Levy, B., Haskins, M.E. and Sands, M.S. (1999) Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2296-2300.
- Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A. and Chiorini, J.A. (2000) Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3428-3432.
- Davis, J.M., Arakawa, T., Strickland, T.W. and Yphantis, D.A. (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*, **26**, 2633-2638.
- Deuschle, U., Meyer, W.K. and Thiesen, H.J. (1995) Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol*, **15**, 1907-1914.
- Di Pasquale, G., Davidson, B.L., Stein, C.S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A. and Chiorini, J.A. (2003) Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med*, **9**, 1306-1312.
- Ding, W., Yan, Z., Zak, R., Saavedra, M., Rodman, D.M. and Engelhardt, J.F. (2003) Second-strand genome conversion of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and AAV-5 is not rate limiting following apical infection of polarized human airway epithelia. *J Virol*, **77**, 7361-7366.

- Donello, J.E., Loeb, J.E. and Hope, T.J. (1998) Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, **72**, 5085-5092.
- Dong, J.Y., Fan, P.D. and Frizzell, R.A. (1996) Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, **7**, 2101-2112.
- Douar, A.M., Poulard, K., Stockholm, D. and Danos, O. (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol*, **75**, 1824-1833.
- Dressman, D., Araishi, K., Imamura, M., Sasaoka, T., Liu, L.A., Engvall, E. and Hoffman, E.P. (2002) Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther*, **13**, 1631-1646.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K.J. and Engelhardt, J.F. (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol*, **72**, 8568-8577.
- Duan, D., Yan, Z., Yue, Y., Ding, W. and Engelhardt, J.F. (2001) Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation. *J Virol*, **75**, 7662-7671.
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J. and Engelhardt, J.F. (2000) Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest*, **105**, 1573-1587.
- Duggan, D.J., Manchester, D., Stears, K.P., Mathews, D.J., Hart, C. and Hoffman, E.P. (1997) Mutations in the delta-sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics*, **1**, 49-58.
- Duisit, G., Conrath, H., Saleun, S., Folliot, S., Provost, N., Cosset, F.L., Sandrin, V., Moullier, P. and Rolling, F. (2002) Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol Ther*, **6**, 446-454.
- Dutheil, N., Shi, F., Dupressoir, T. and Linden, R.M. (2000) Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4862-4866.
- Dutheil, N., Yoon-Robarts, M., Ward, P., Henckaerts, E., Skrabanek, L., Berns, K.I., Campagne, F. and Linden, R.M. (2004) Characterization of the mouse adeno-associated virus AAVS1 ortholog. *J Virol*, **78**, 8917-8921.
- Eckardt, K.U. and Casadevall, N. (2003) Pure red-cell aplasia due to anti-erythropoietin antibodies. *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 865-869.
- Egrie, J.C. and Browne, J.K. (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer*, **1**, 3-10.

- Ellinwood, N.M., Vite, C.H. and Haskins, M.E. (2004) Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med*, **6**, 481-506.
- Erles, K., Sebokova, P. and Schlehofer, J.R. (1999) Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol*, **59**, 406-411.
- Erslev, A.J. (1991) Erythropoietin. *N Engl J Med*, **324**, 1339-1344.
- Evans, J.P., Brinkhous, K.M., Brayer, G.D., Reisner, H.M. and High, K.A. (1989) Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 10095-10099.
- Fabb, S.A., Wells, D.J., Serpente, P. and Dickson, G. (2002) Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet*, **11**, 733-741.
- Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marme, F., Cherel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B., Heard, J.M., Riviere, Y. and Moullier, P. (2002) Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol*, **76**, 11605-11611.
- Favre, D., Cherel, Y., Provost, N., Blouin, V., Ferry, N., Moullier, P. and Salvetti, A. (2000) Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. *Gene Ther*, **7**, 1417-1420.
- Favre, D., Provost, N., Blouin, V., Blanche, G., Cherel, Y., Salvetti, A. and Moullier, P. (2001) Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther*, **4**, 559-566.
- Fender, P., Jeanson, L., Ivanov, M.A., Colin, P., Mallet, J., Dedieu, J.F. and Latta-Mahieu, M. (2002) Controlled transgene expression by E1-E4-defective adenovirus vectors harbouring a "tet-on" switch system. *J Gene Med*, **4**, 668-675.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. and Samulski, R.J. (1996) Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol*, **70**, 3227-3234.
- Ferrer, A., Foster, H., Wells, K.E., Dickson, G. and Wells, D.J. (2004) Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Ther*, **11**, 884-893.
- Fisher, J.W. (2003) Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med*, **228**, 1-14.
- Fisher, K.J., Gao, G.P., Weitzman, M.D., DeMatteo, R., Burda, J.F. and Wilson, J.M. (1996) Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol*, **70**, 520-532.

- Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S.E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. and Wilson, J.M. (1997) Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med*, **3**, 306-312.
- Fitzsimons, H.L., McKenzie, J.M. and Durning, M.J. (2001) Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther*, **8**, 1675-1681.
- Flotte, T., Carter, B., Conrad, C., Guggino, W., Reynolds, T., Rosenstein, B., Taylor, G., Walden, S. and Wetzel, R. (1996) A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther*, **7**, 1145-1159.
- Flotte, T.R. (2004a) Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther*, **11**, 805-810.
- Flotte, T.R. (2004b) Immune responses to recombinant adeno-associated virus vectors: putting preclinical findings into perspective. *Hum Gene Ther*, **15**, 716-717.
- Flotte, T.R., Afione, S.A., Conrad, C., McGrath, S.A., Solow, R., Oka, H., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B. and Carter, B.J. (1993a) Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10613-10617.
- Flotte, T.R., Afione, S.A., Solow, R., Drumm, M.L., Markakis, D., Guggino, W.B., Zeitlin, P.L. and Carter, B.J. (1993b) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem*, **268**, 3781-3790.
- Flotte, T.R., Brantly, M.L., Spencer, L.T., Byrne, B.J., Spencer, C.T., Baker, D.J. and Humphries, M. (2004) Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther*, **15**, 93-128.
- Flotte, T.R., Zeitlin, P.L., Reynolds, T.C., Heald, A.E., Pedersen, P., Beck, S., Conrad, C.K., Brass-Ernst, L., Humphries, M., Sullivan, K., Wetzel, R., Taylor, G., Carter, B.J. and Guggino, W.B. (2003) Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther*, **14**, 1079-1088.
- Folliot, S., Briot, D., Conrath, H., Provost, N., Cherel, Y., Moullier, P. and Rolling, F. (2003) Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med*, **5**, 493-501.
- Freundlieb, S., Schirra-Muller, C. and Bujard, H. (1999) A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med*, **1**, 4-12.
- Galactéros, F. & Beuzard, Y. (1992). Thalassémies et hémoglobines anormales. In *L'hématologie de Bernard Dreyfus*, pp. 359-406. Edited by J. Breton-Gorius, F. Reyes, H. Rochant, J. Rosa & J. P. Vernant. Paris: Médecine-Science, Flammarion.

- Gao, G., Alvira, M.R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L.H., Rux, J.J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z. and Wilson, J.M. (2003) Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6081-6086.
- Gao, G., Lebherz, C., Weiner, D.J., Grant, R., Calcedo, R., McCullough, B., Bagg, A., Zhang, Y. and Wilson, J.M. (2004a) Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood*, **103**, 3300-3302.
- Gao, G., Qu, G., Burnham, M.S., Huang, J., Chirmule, N., Joshi, B., Yu, Q.C., Marsh, J.A., Conceicao, C.M. and Wilson, J.M. (2000) Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo. *Hum Gene Ther*, **11**, 2079-2091.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X. and Wilson, J.M. (2004b) Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*, **78**, 6381-6388.
- Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J. and Wilson, J.M. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11854-11859.
- Gassmann, M., Heinicke, K., Soliz, J., Ogunshola, O.O., Marti, H.H., Hofer, T., Grimm, C., Heinicke, I. and Egli, B. (2003) Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol*, **543**, 323-330.
- Ge, Y., Powell, S., Van Roey, M. and McArthur, J.G. (2001) Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood*, **97**, 3733-3737.
- Ginhoux, F., Turbant, S., Gross, D.A., Poupiot, J., Marais, T., Lone, Y., Lemonnier, F.A., Firat, H., Perez, N., Danos, O. and Davoust, J. (2004) HLA-A*0201-restricted cytolytic responses to the rtTA transactivator dominant and cryptic epitopes compromise transgene expression induced by the tetracycline on system. *Mol Ther*, **10**, 279-289.
- Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K.I. (1995) Recombinant junctions formed by site-specific integration of adeno-associated virus into an episome. *J Virol*, **69**, 6917-6924.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1993) Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4411-4412.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.

- Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W. and Chamberlain, J.S. (2004) Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med*, **10**, 828-834.
- Grimm, D., Kay, M.A. and Kleinschmidt, J.A. (2003a) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther*, **7**, 839-850.
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. and Kleinschmidt, J.A. (1998) Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther*, **9**, 2745-2760.
- Grimm, D., Zhou, S., Nakai, H., Thomas, C.E., Storm, T.A., Fuess, S., Matsushita, T., Allen, J., Surosky, R., Lochrie, M., Meuse, L., McClelland, A., Colosi, P. and Kay, M.A. (2003b) Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood*, **102**, 2412-2419.
- Gross, D.A., Leboeuf, M., Gjata, B., Danos, O. and Davoust, J. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit immune-mediated transgene rejection. *Blood*, **102**, 4326-4328.
- Grossman, Z., Mendelson, E., Brok-Simoni, F., Mileguir, F., Leitner, Y., Rechavi, G. and Ramot, B. (1992) Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *J Gen Virol*, **73**, 961-966.
- Haberman, R.P., McCown, T.J. and Samulski, R.J. (2000) Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol*, **74**, 8732-8739.
- Hagstrom, J.N., Couto, L.B., Scallan, C., Burton, M., McClelland, M.L., Fields, P.A., Arruda, V.R., Herzog, R.W. and High, K.A. (2000) Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood*, **95**, 2536-2542.
- Halbert, C.L., Standaert, T.A., Aitken, M.L., Alexander, I.E., Russell, D.W. and Miller, A.D. (1997) Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration. *J Virol*, **71**, 5932-5941.
- Hamilton, H., Gomos, J., Berns, K.I. and Falck-Pedersen, E. (2004) Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J Virol*, **78**, 7874-7882.
- Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Barbet, F., Ducroq, D., Calvas, P., Dollfus, H., Hamel, C., Lopponen, T., Munier, F., Santos, L., Shalev, S., Zafeiriou, D., Dufier, J.L., Munnich, A., Rozet, J.M. and Kaplan, J. (2004) Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*, **23**, 306-317.
- Hansen, J., Qing, K. and Srivastava, A. (2001a) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol*, **75**, 4080-4090.

- Hansen, J., Qing, K. and Srivastava, A. (2001b) Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther*, **4**, 289-296.
- Hauck, B., Chen, L. and Xiao, W. (2003) Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther*, **7**, 419-425.
- Hauck, B. and Xiao, W. (2003) Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol*, **77**, 2768-2774.
- Herzog, R.W., Fields, P.A., Arruda, V.R., Brubaker, J.O., Armstrong, E., McClintock, D., Bellinger, D.A., Couto, L.B., Nichols, T.C. and High, K.A. (2002) Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther*, **13**, 1281-1291.
- Herzog, R.W., Hagstrom, J.N., Kung, S.H., Tai, S.J., Wilson, J.M., Fisher, K.J. and High, K.A. (1997) Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5804-5809.
- Herzog, R.W., Mount, J.D., Arruda, V.R., High, K.A. and Lothrop, C.D., Jr. (2001) Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther*, **4**, 192-200.
- Herzog, R.W., Yang, E.Y., Couto, L.B., Hagstrom, J.N., Elwell, D., Fields, P.A., Burton, M., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Podsakoff, G.M., Nichols, T.C., Kurtzman, G.J. and High, K.A. (1999) Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med*, **5**, 56-63.
- Hildinger, M., Auricchio, A., Gao, G., Wang, L., Chirmule, N. and Wilson, J.M. (2001) Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol*, **75**, 6199-6203.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M. and Linhardt, R.J. (1998) Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays*, **20**, 156-167.
- Hoggan, M.D., Blacklow, N.R. and Rowe, W.P. (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**, 1467-1474.
- Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S.I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H. and Handa, H. (1999) Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol*, **73**, 7912-7915.
- Hunter, L.A. and Samulski, R.J. (1992) Colocalization of adeno-associated virus Rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells. *J Virol*, **66**, 317-324.
- Huser, D., Weger, S. and Heilbronn, R. (2003) Packaging of human chromosome 19-specific adeno-associated virus (AAV) integration sites in AAV virions during AAV wild-type and recombinant AAV vector production. *J Virol*, **77**, 4881-4887.

- Imren, S., Payen, E., Westerman, K.A., Pawliuk, R., Fabry, M.E., Eaves, C.J., Cavilla, B., Wadsworth, L.D., Beuzard, Y., Bouhassira, E.E., Russell, R., London, I.M., Nagel, R.L., Leboulch, P. and Humphries, R.K. (2002) Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14380-14385.
- Johnston, J., Tazelaar, J., Rivera, V.M., Clackson, T., Gao, G.P. and Wilson, J.M. (2003) Regulated expression of erythropoietin from an AAV vector safely improves the anemia of beta-thalassemia in a mouse model. *Mol Ther*, **7**, 493-497.
- Jooss, K. and Chirmule, N. (2003) Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther*, **10**, 955-963.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K.J. and Wilson, J.M. (1998) Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol*, **72**, 4212-4223.
- Kaludov, N., Brown, K.E., Walters, R.W., Zabner, J. and Chiorini, J.A. (2001) Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol*, **75**, 6884-6893.
- Kaludov, N., Handelman, B. and Chiorini, J.A. (2002) Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Hum Gene Ther*, **13**, 1235-1243.
- Kamper, M.R., Gohla, G. and Schluter, G. (2002) A novel positive tetracycline-dependent transactivator (rtTA) variant with reduced background activity and enhanced activation potential. *FEBS Lett*, **517**, 115-120.
- Kanazawa, T., Mizukami, H., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Nishino, H., Takeuchi, K., Kitamura, K., Ichimura, K. and Ozawa, K. (2003) Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther*, **10**, 51-58.
- Kaplitt, M.G., Leone, P., Samulski, R.J., Xiao, X., Pfaff, D.W., O'Malley, K.L. and During, M.J. (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet*, **8**, 148-154.
- Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T. (2001) Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, **11**, 1043-1049.
- Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., Larson, P.J., Couto, L.B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A.J., Tai, S.J., Herzog, R.W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A.W. and High, K.A. (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*, **24**, 257-261.
- Kay, M.A., Meuse, L., Gown, A.M., Linsley, P., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ochs, H.D. and Wilson, C.B. (1997) Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody

- and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4686-4691.
- Kells, A.P., Fong, D.M., Dragunow, M., During, M.J., Young, D. and Connor, B. (2004) AAV-mediated gene delivery of BDNF or GDNF is neuroprotective in a model of Huntington disease. *Mol Ther*, **9**, 682-688.
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A. and Kleinschmidt, J.A. (2003) Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol*, **77**, 11072-11081.
- Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J. and Byrne, B.J. (1996) Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14082-14087.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H. and Bujard, H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10933-10938.
- Kotin, R.M. (1994) Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther*, **5**, 793-801.
- Kotin, R.M., Linden, R.M. and Berns, K.I. (1992) Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J*, **11**, 5071-5078.
- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M. and Berns, K.I. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2211-2215.
- Koury, M.J. and Bondurant, M.C. (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*, **248**, 378-381.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C., Koury, M.J. and Semenza, G.L. (1991) Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, **77**, 2497-2503.
- Krantz, S.B. (1991) Erythropoietin. *Blood*, **77**, 419-434.
- Kronenberg, S., Kleinschmidt, J.A. and Bottcher, B. (2001) Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep*, **2**, 997-1002.
- Lackner, D.F. and Muzyczka, N. (2002) Studies of the mechanism of transactivation of the adeno-associated virus p19 promoter by Rep protein. *J Virol*, **76**, 8225-8235.
- Lai, P.H., Everett, R., Wang, F.F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*, **261**, 3116-3121.
- Lamartina, S., Roscilli, G., Rinaudo, C.D., Sporeno, E., Silvi, L., Hillen, W., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G. and Toniatti, C. (2002) Stringent control of gene expression

- in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther*, **13**, 199-210.
- Lamartina, S., Silvi, L., Roscilli, G., Casimiro, D., Simon, A.J., Davies, M.E., Shiver, J.W., Rinaudo, C.D., Zampaglione, I., Fattori, E., Colloca, S., Gonzalez Paz, O., Laufer, R., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G. and Toniatti, C. (2003) Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol Ther*, **7**, 271-280.
- Lasne, F. and de Ceaurreiz, J. (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, **405**, 635.
- Lasne, F., Martin, L., Crepin, N. and de Ceaurreiz, J. (2002) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem*, **311**, 119-126.
- Latta-Mahieu, M., Rolland, M., Caillet, C., Wang, M., Kennel, P., Mahfouz, I., Loquet, I., Dedieu, J.F., Mahfoudi, A., Trannoy, E. and Thuillier, V. (2002) Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum Gene Ther*, **13**, 1611-1620.
- Lavelle, D., Molokie, R., Ducksworth, J. and DeSimone, J. (2001) Effects of hydroxurea, stem cell factor, and erythropoietin in combination on fetal hemoglobin in the baboon. *Exp Hematol*, **29**, 156-162.
- Lewis, B.A., Tullis, G., Seto, E., Horikoshi, N., Weinmann, R. and Shenk, T. (1995) Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *J Virol*, **69**, 1628-1636.
- Li, Z., Marchand, P., Humbert, J., Babinet, C. and Paulin, D. (1993) Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Development*, **117**, 947-959.
- Li, Z.L. and Paulin, D. (1991) High level desmin expression depends on a muscle-specific enhancer. *J Biol Chem*, **266**, 6562-6570.
- Lin, F.K., Lin, C.H., Lai, P.H., Browne, J.K., Egrie, J.C., Smalling, R., Fox, G.M., Chen, K.K., Castro, M. and Suggs, S. (1986) Monkey erythropoietin gene: cloning, expression and comparison with the human erythropoietin gene. *Gene*, **44**, 201-209.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z. and et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7580-7584.
- Lin, H.F., Maeda, N., Smithies, O., Straight, D.L. and Stafford, D.W. (1997) A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood*, **90**, 3962-3966.
- Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K.I. (1996a) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11288-11294.
- Linden, R.M., Winocour, E. and Berns, K.I. (1996b) The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7966-7972.

- Liu, J. and Thorp, S.C. (2002) Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. *Med Res Rev*, **22**, 1-25.
- Locatelli, F., Pisoni, R.L., Combe, C., Bommer, J., Andreucci, V.E., Piera, L., Greenwood, R., Feldman, H.I., Port, F.K. and Held, P.J. (2004) Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant*, **19**, 121-132.
- Loeb, J.E., Cordier, W.S., Harris, M.E., Weitzman, M.D. and Hope, T.J. (1999) Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther*, **10**, 2295-2305.
- Lotery, A.J., Yang, G.S., Mullins, R.F., Russell, S.R., Schmidt, M., Stone, E.M., Lindbloom, J.D., Chiorini, J.A., Kotin, R.M. and Davidson, B.L. (2003) Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther*, **14**, 1663-1671.
- Magari, S.R., Rivera, V.M., Iuliucci, J.D., Gilman, M. and Cerasoli, F., Jr. (1997) Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. *J Clin Invest*, **100**, 2865-2872.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M.V., Thompson, A., Ozelo, M., Couto, L.B., Leonard, D.G., Johnson, F.A., McClelland, A., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A.W., Kay, M.A., High, K.A. and Glader, B. (2003) AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*, **101**, 2963-2972.
- Mastakov, M.Y., Baer, K., Xu, R., Fitzsimons, H. and During, M.J. (2001) Combined injection of rAAV with mannitol enhances gene expression in the rat brain. *Mol Ther*, **3**, 225-232.
- Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301-305.
- Maurer, M.H., Frietsch, T., Waschke, K.F., Kuschinsky, W., Gassmann, M. and Schneider, A. (2002) Cerebral transcriptome analysis of transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Neurosci Lett*, **327**, 181-184.
- Mauser, A.E., Whitlark, J., Whitney, K.M. and Lothrop, C.D., Jr. (1996) A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood*, **88**, 3451-3455.
- Mayeux, P., Casadevall, N., Muller, O. and Lacombe, C. (1990) Glycosylation of the murine erythropoietin receptor. *FEBS Lett*, **269**, 167-170.
- McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P. and Samulski, R.J. (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther*, **10**, 2112-2118.

- McCarty, D.M., Monahan, P.E. and Samulski, R.J. (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther*, **8**, 1248-1254.
- McCarty, D.M., Pereira, D.J., Zolotukhin, I., Zhou, X., Ryan, J.H. and Muzyczka, N. (1994) Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol*, **68**, 4988-4997.
- McGee Sanftner, L.H., Rendahl, K.G., Quiroz, D., Coyne, M., Ladner, M., Manning, W.C. and Flannery, J.G. (2001) Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther*, **3**, 688-696.
- McLaughlin, S.K., Collis, P., Hermonat, P.L. and Muzyczka, N. (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol*, **62**, 1963-1973.
- Mehrle, S., Rohde, V. and Schlehofer, J.R. (2004) Evidence of chromosomal integration of AAV DNA in human testis tissue. *Virus Genes*, **28**, 61-69.
- Meneses, P., Berns, K.I. and Winocour, E. (2000) DNA sequence motifs which direct adeno-associated virus site-specific integration in a model system. *J Virol*, **74**, 6213-6216.
- Miao, C.H., Nakai, H., Thompson, A.R., Storm, T.A., Chiu, W., Snyder, R.O. and Kay, M.A. (2000) Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol*, **74**, 3793-3803.
- Miao, C.H., Snyder, R.O., Schowalter, D.B., Patijn, G.A., Donahue, B., Winther, B. and Kay, M.A. (1998) The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet*, **19**, 13-15.
- Miller, D.G., Rutledge, E.A. and Russell, D.W. (2002) Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet*, **30**, 147-148.
- Mingozzi, F., Liu, Y.L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A. and Herzog, R.W. (2003) Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest*, **111**, 1347-1356.
- Mingozzi, F., Schuttrumpf, J., Arruda, V.R., Liu, Y., Liu, Y.L., High, K.A., Xiao, W. and Herzog, R.W. (2002) Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector. *J Virol*, **76**, 10497-10502.
- Miyake, T., Kung, C.K. and Goldwasser, E. (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*, **252**, 5558-5564.
- Mizuguchi, H. and Hayakawa, T. (2002) The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J Gene Med*, **4**, 240-247.
- Mizukami, H., Young, N.S. and Brown, K.E. (1996) Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein. *Virology*, **217**, 124-130.

- Monahan, P.E. and Samulski, R.J. (2000) AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther*, **7**, 24-30.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B.A., Snyder, R.O., McArthur, J.G. and Patel, S.D. (2000) Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*, **74**, 1761-1766.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Bellinger, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., Jr. and High, K.A. (2002) Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood*, **99**, 2670-2676.
- Muenzer, J. and Fisher, A. (2004) Advances in the treatment of mucopolysaccharidosis type I. *N Engl J Med*, **350**, 1932-1934.
- Muller, O.J., Kaul, F., Weitzman, M.D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J.A. and Trepel, M. (2003) Random peptide libraries displayed on adenovirus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol*, **21**, 1040-1046.
- Muzyczka, N. (1992) Use of adenovirus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **158**, 97-129.
- Naffakh, N., Pinset, C., Montarras, D., Li, Z., Paulin, D., Danos, O. and Heard, J.M. (1996) Long-term secretion of therapeutic proteins from genetically modified skeletal muscles. *Hum Gene Ther*, **7**, 11-21.
- Nakai, H., Iwaki, Y., Kay, M.A. and Couto, L.B. (1999) Isolation of recombinant adenovirus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol*, **73**, 5438-5447.
- Nakai, H., Storm, T.A. and Kay, M.A. (2000) Recruitment of single-stranded recombinant adenovirus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol*, **74**, 9451-9463.
- Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L. and Kay, M.A. (2001) Extrachromosomal recombinant adenovirus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol*, **75**, 6969-6976.
- Nathwani, A.C., Davidoff, A., Hanawa, H., Zhou, J.F., Vanin, E.F. and Nienhuis, A.W. (2001) Factors influencing in vivo transduction by recombinant adenovirus vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood*, **97**, 1258-1265.
- Negishi, A., Chen, J., McCarty, D., Samulski, R.J., Liu, J. and Superfine, R. (2004) Analysis of the interaction of adenovirus and heparan sulfate using atomic force microscopy. *Glycobiology*, **23**, 23.
- Ni, T.H., Zhou, X., McCarty, D.M., Zolotukhin, I. and Muzyczka, N. (1994) In vitro replication of adenovirus DNA. *J Virol*, **68**, 1128-1138.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, **108**, 193-199.

- No, D., Yao, T.P. and Evans, R.M. (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3346-3351.
- Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P. and Salvetti, A. (2003) Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J Virol*, **77**, 776-781.
- Nony, P., Tessier, J., Chadeuf, G., Ward, P., Giraud, A., Dugast, M., Linden, R.M., Moullier, P. and Salvetti, A. (2001) Novel cis-acting replication element in the adeno-associated virus type 2 genome is involved in amplification of integrated rep-cap sequences. *J Virol*, **75**, 9991-9994.
- Oh, I.H., Fabry, M.E., Humphries, R.K., Pawliuk, R., Leboulch, P., Hoffman, R., Nagel, R.L. and Eaves, C. (2004) Expression of an anti-sickling beta-globin in human erythroblasts derived from retrovirally transduced primitive normal and sickle cell disease hematopoietic cells. *Exp Hematol*, **32**, 461-469.
- Olivieri, N.F. (1999) The beta-thalassemias. *N Engl J Med*, **341**, 99-109.
- Olivieri, N.F., Rees, D.C., Ginder, G.D., Thein, S.L., Waye, J.S., Chang, L., Brittenham, G.M. and Weatherall, D.J. (1998) Elimination of transfusions through induction of fetal hemoglobin synthesis in Cooley's anemia. *Ann N Y Acad Sci*, **850**, 100-109.
- Opie, S.R., Warrington, K.H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. and Muzyczka, N. (2003) Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol*, **77**, 6995-7006.
- O'Riordan, C.R., Lachapelle, A.L., Vincent, K.A. and Wadsworth, S.C. (2000) Scaleable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV). *J Gene Med*, **2**, 444-454.
- Park, J., Murray, G.J., Limaye, A., Quirk, J.M., Gelderman, M.P., Brady, R.O. and Qasba, P. (2003) Long-term correction of globotriaosylceramide storage in Fabry mice by recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3450-3454.
- Passini, M.A., Watson, D.J., Vite, C.H., Landsburg, D.J., Feigenbaum, A.L. and Wolfe, J.H. (2003) Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol*, **77**, 7034-7040.
- Pawliuk, R., Westerman, K.A., Fabry, M.E., Payen, E., Tighe, R., Bouhassira, E.E., Acharya, S.A., Ellis, J., London, I.M., Eaves, C.J., Humphries, R.K., Beuzard, Y., Nagel, R.L. and Leboulch, P. (2001) Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science*, **294**, 2368-2371.
- Payen, E., Bettan, M., Rouyer-Fessard, P., Beuzard, Y. and Scherman, D. (2001) Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Exp Hematol*, **29**, 295-300.

- Payen, E., Feugeas, J. P. & Beuzard, Y. (2001b). Thérapie génique des hémoglobinopathies. In *La thérapie génique*, pp. 351-367. Edited by O. Cohen-Haguenauer. Paris
- Pereira, D.J., McCarty, D.M. and Muzyczka, N. (1997) The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, **71**, 1079-1088.
- Pereira, D.J. and Muzyczka, N. (1997) The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter. *J Virol*, **71**, 1747-1756.
- Perez, N., Plence, P., Millet, V., Greuet, D., Minot, C., Noel, D., Danos, O., Jorgensen, C. and Apparailly, F. (2002) Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum Gene Ther*, **13**, 2161-2172.
- Petrof, B.J. (1998) The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem*, **179**, 111-123.
- Philpott, N.J., Giraud-Wali, C., Dupuis, C., Gomos, J., Hamilton, H., Berns, K.I. and Falck-Pedersen, E. (2002a) Efficient integration of recombinant adeno-associated virus DNA vectors requires a p5-rep sequence in cis. *J Virol*, **76**, 5411-5421.
- Philpott, N.J., Gomos, J., Berns, K.I. and Falck-Pedersen, E. (2002b) A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12381-12385.
- Ponder, K.P., Melniczek, J.R., Xu, L., Weil, M.A., O'Malley, T.M., O'Donnell, P.A., Knox, V.W., Aguirre, G.D., Mazrier, H., Ellinwood, N.M., Sleeper, M., Maguire, A.M., Volk, S.W., Mango, R.L., Zweigle, J., Wolfe, J.H. and Haskins, M.E. (2002) Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13102-13107.
- Ponnazhagan, S., Mahendra, G., Curiel, D.T. and Shaw, D.R. (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for ex vivo immunotherapy. *J Virol*, **75**, 9493-9501.
- Pruchnic, R., Cao, B., Peterson, Z.Q., Xiao, X., Li, J., Samulski, R.J., Epperly, M. and Huard, J. (2000) The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther*, **11**, 521-536.
- Qing, K., Hansen, J., Weigel-Kelley, K.A., Tan, M., Zhou, S. and Srivastava, A. (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression. *J Virol*, **75**, 8968-8976.
- Qing, K., Khuntirat, B., Mah, C., Kube, D.M., Wang, X.S., Ponnazhagan, S., Zhou, S., Dwarki, V.J., Yoder, M.C. and Srivastava, A. (1998) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol*, **72**, 1593-1599.

- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V. and Srivastava, A. (1999) Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med*, **5**, 71-77.
- Qing, K., Wang, X.S., Kube, D.M., Ponnazhagan, S., Bajpai, A. and Srivastava, A. (1997) Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10879-10884.
- Qiu, J. and Pintel, D.J. (2002) The adeno-associated virus type 2 Rep protein regulates RNA processing via interaction with the transcription template. *Mol Cell Biol*, **22**, 3639-3652.
- Rabinowitz, J.E., Bowles, D.E., Faust, S.M., Ledford, J.G., Cunningham, S.E. and Samulski, R.J. (2004) Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J Virol*, **78**, 4421-4432.
- Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X. and Samulski, R.J. (2002) Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol*, **76**, 791-801.
- Rabinowitz, J.E., Xiao, W. and Samulski, R.J. (1999) Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology*, **265**, 274-285.
- Recny, M.A., Scoble, H.A. and Kim, Y. (1987) Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem*, **262**, 17156-17163.
- Rendahl, K.G., Leff, S.E., Otten, G.R., Spratt, S.K., Bohl, D., Van Roey, M., Donahue, B.A., Cohen, L.K., Mandel, R.J., Danos, O. and Snyder, R.O. (1998) Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol*, **16**, 757-761.
- Rendahl, K.G., Quiroz, D., Ladner, M., Coyne, M., Seltzer, J., Manning, W.C. and Escobedo, J.A. (2002) Tightly regulated long-term erythropoietin expression in vivo using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, **13**, 335-342.
- Rivera, V.M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J.F., Keenan, T., Magari, S.R., Phillips, T., Courage, N.L., Cerasoli, F., Jr., Holt, D.A. and Gilman, M. (1996) A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med*, **2**, 1028-1032.
- Rivera, V.M., Ye, X., Courage, N.L., Sachar, J., Cerasoli, F., Jr., Wilson, J.M. and Gilman, M. (1999) Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8657-8662.
- Rose, J.A., Maizel, J.V., Jr., Inman, J.K. and Shatkin, A.J. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J Virol*, **8**, 766-770.
- Rudich, S.M., Zhou, S., Srivastava, R., Escobedo, J.A., Perez, R.V. and Manning, W.C. (2000) Dose response to a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus-erythropoietin in monkeys. *J Surg Res*, **90**, 102-108.

- Ruffing, M., Heid, H. and Kleinschmidt, J.A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol*, **75**, 3385-3392.
- Russell, D.W., Alexander, I.E. and Miller, A.D. (1995) DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5719-5723.
- Russell, D.W. and Kay, M.A. (1999) Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood*, **94**, 864-874.
- Rutledge, E.A., Halbert, C.L. and Russell, D.W. (1998) Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol*, **72**, 309-319.
- Salucci, V., Scarito, A., Aurisicchio, L., Lamartina, S., Nicolaus, G., Giampaoli, S., Gonzalez-Paz, O., Toniatti, C., Bujard, H., Hillen, W., Ciliberto, G. and Palombo, F. (2002) Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther*, **9**, 1415-1421.
- Salveti, A., Oreve, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J. and Moullier, P. (1998) Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther*, **9**, 695-706.
- Samakoglu, S., Bohl, D. and Heard, J.M. (2002) Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. *Mol Ther*, **6**, 793-803.
- Samakoglu, S., Fattori, E., Lamartina, S., Toniatti, C., Stockholm, D., Heard, J.M. and Bohl, D. (2001) betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles. *Blood*, **97**, 2213-2220.
- Samulski, R.J., Berns, K.I., Tan, M. and Muzyczka, N. (1982) Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 2077-2081.
- Samulski, R.J. and Shenk, T. (1988) Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J Virol*, **62**, 206-210.
- Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N. and Hunter, L.A. (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J*, **10**, 3941-3950.
- Sanlioglu, S., Benson, P.K., Yang, J., Atkinson, E.M., Reynolds, T. and Engelhardt, J.F. (2000) Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, **74**, 9184-9196.

- Sarkar, R., Tetreault, R., Gao, G., Wang, L., Bell, P., Chandler, R., Wilson, J.M. and Kazazian, H.H., Jr. (2004) Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood*, **103**, 1253-1260.
- Sarukhan, A., Camugli, S., Gjata, B., von Boehmer, H., Danos, O. and Jooss, K. (2001a) Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol*, **75**, 269-277.
- Sarukhan, A., Soudais, C., Danos, O. and Jooss, K. (2001b) Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gene Med*, **3**, 260-270.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A. and Fukuda, M. (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem*, **262**, 12059-12076.
- Scallan, C.D., Lillicrap, D., Jiang, H., Qian, X., Patarroyo-White, S.L., Parker, A.E., Liu, T., Vargas, J., Nagy, D., Powell, S.K., Wright, J.F., Turner, P.V., Tinlin, S.J., Webster, S.E., McClelland, A. and Couto, L.B. (2003) Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood*, **102**, 2031-2037.
- Schellekens, H. and Crommelin, D.J. (2003) Equivocal role of micelles in Eprex adverse events. *Nat Biotechnol*, **21**.
- Schneider, R.J., Weinberger, C. and Shenk, T. (1984) Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus-infected cells. *Cell*, **37**, 291-298.
- Schnepp, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A. and Johnson, P.R. (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol*, **77**, 3495-3504.
- Seisenberger, G., Ried, M.U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M. and Brauchle, C. (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science*, **294**, 1929-1932.
- Serguera, C., Bohl, D., Rolland, E., Prevost, P. and Heard, J.M. (1999) Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum Gene Ther*, **10**, 375-383.
- Sferra, T.J., Backstrom, K., Wang, C., Rennard, R., Miller, M. and Hu, Y. (2004) Widespread Correction of Lysosomal Storage Following Intrahepatic Injection of a Recombinant Adeno-associated Virus in the Adult MPS VII Mouse. *Mol Ther*, **10**, 478-491.
- Shi, W. and Bartlett, J.S. (2003) RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol Ther*, **7**, 515-525.
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S. and Shenk, T. (1991) Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*, **67**, 377-388.

- Skibeli, V., Nissen-Lie, G. and Torjesen, P. (2001) Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, **98**, 3626-3634.
- Smith, A.E. and Helenius, A. (2004) How viruses enter animal cells. *Science*, **304**, 237-242.
- Smith, A.J., Schlichtenbrede, F.C., Tschernutter, M., Bainbridge, J.W., Thrasher, A.J. and Ali, R.R. (2003) AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, **8**, 188-195.
- Smith, R.H. and Kotin, R.M. (2000) An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J Virol*, **74**, 3122-3129.
- Smith-Arica, J.R., Morelli, A.E., Larregina, A.T., Smith, J., Lowenstein, P.R. and Castro, M.G. (2000) Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression. *Mol Ther*, **2**, 579-587.
- Smith-Arica, J.R., Williams, J.C., Stone, D., Smith, J., Lowenstein, P.R. and Castro, M.G. (2001) Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland in vivo. *Endocrinology*, **142**, 2521-2532.
- Snyder, R.O. (1999) Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med*, **1**, 166-175.
- Snyder, R.O., Miao, C., Meuse, L., Tubb, J., Donahue, B.A., Lin, H.F., Stafford, D.W., Patel, S., Thompson, A.R., Nichols, T., Read, M.S., Bellinger, D.A., Brinkhous, K.M. and Kay, M.A. (1999) Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med*, **5**, 64-70.
- Snyder, R.O., Miao, C.H., Patijn, G.A., Spratt, S.K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A.M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L.K., Thompson, A.R. and Kay, M.A. (1997a) Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet*, **16**, 270-276.
- Snyder, R.O., Spratt, S.K., Lagarde, C., Bohl, D., Kaspar, B., Sloan, B., Cohen, L.K. and Danos, O. (1997b) Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther*, **8**, 1891-1900.
- Song, S., Embury, J., Laipis, P.J., Berns, K.I., Crawford, J.M. and Flotte, T.R. (2001a) Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther*, **8**, 1299-1306.
- Song, S., Laipis, P.J., Berns, K.I. and Flotte, T.R. (2001b) Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4084-4088.
- Song, S., Morgan, M., Ellis, T., Poirier, A., Chesnut, K., Wang, J., Brantly, M., Muzyczka, N., Byrne, B.J., Atkinson, M. and Flotte, T.R. (1998) Sustained secretion of human

- alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14384-14388.
- Song, S., Scott-Jorgensen, M., Wang, J., Poirier, A., Crawford, J., Campbell-Thompson, M. and Flotte, T.R. (2002) Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 alpha-1 antitrypsin (rAAV-SERPINA1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects. *Mol Ther*, **6**, 329-335.
- Srivastava, A., Lusby, E.W. and Berns, K.I. (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol*, **45**, 555-564.
- Storring, P.L. and Yuen, C.T. (2003) Differences between the N-glycans of human serum erythropoietin and recombinant human erythropoietin. *Blood*, **101**, 1204-1205.
- Summerford, C., Bartlett, J.S. and Samulski, R.J. (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med*, **5**, 78-82.
- Summerford, C. and Samulski, R.J. (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol*, **72**, 1438-1445.
- Sun, J.Y., Anand-Jawa, V., Chatterjee, S. and Wong, K.K. (2003) Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther*, **10**, 964-976.
- Surosky, R.T., Urabe, M., Godwin, S.G., McQuiston, S.A., Kurtzman, G.J., Ozawa, K. and Natsoulis, G. (1997) Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol*, **71**, 7951-7959.
- Tam, R.C., Coleman, S.L., Tiplady, R.J., Storring, P.L. and Cotes, P.M. (1991) Comparisons of human, rat and mouse erythropoietins by isoelectric focusing: differences between serum and urinary erythropoietins. *Br J Haematol*, **79**, 504-511.
- Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J. and Levivier, M. (2004) Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med*, **6**, S212-222.
- Tessier, J., Chadeuf, G., Nony, P., Avet-Loiseau, H., Moullier, P. and Salvetti, A. (2001) Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus rep-cap sequences. *J Virol*, **75**, 375-383.
- Thomas, C.E., Storm, T.A., Huang, Z. and Kay, M.A. (2004) Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol*, **78**, 3110-3122.
- Tobiasch, E., Rabreau, M., Geletneky, K., Larue-Charlus, S., Severin, F., Becker, N. and Schlehofer, J.R. (1994) Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion. *J Med Virol*, **44**, 215-222.
- Toniatti, C., Bujard, H., Cortese, R. and Ciliberto, G. (2004) Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther*, **11**, 649-657.

- Toublanc, E., Benraiss, A., Bonnin, D., Blouin, V., Brument, N., Cartier, N., Epstein, A.L., Moullier, P. and Salvetti, A. (2004) Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J Gene Med*, **6**, 555-564.
- Tripathy, S.K., Black, H.B., Goldwasser, E. and Leiden, J.M. (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med*, **2**, 545-550.
- Tullis, G.E. and Shenk, T. (2000) Efficient replication of adeno-associated virus type 2 vectors: a cis-acting element outside of the terminal repeats and a minimal size. *J Virol*, **74**, 11511-11521.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H. and Hillen, W. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7963-7968.
- Vigna, E., Cavalieri, S., Ailles, L., Geuna, M., Loew, R., Bujard, H. and Naldini, L. (2002) Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther*, **5**, 252-261.
- Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E. and Brenner, M.K. (2004) Antigen-induced regulatory T cells. *Blood*, **104**, 26-33.
- Vincent-Lacaze, N., Snyder, R.O., Gluzman, R., Bohl, D., Lagarde, C. and Danos, O. (1999) Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol*, **73**, 1949-1955.
- Vite, C.H., Passini, M.A., Haskins, M.E. and Wolfe, J.H. (2003) Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther*, **10**, 1874-1881.
- Wagner, J.A., Moran, M.L., Messner, A.H., Daifuku, R., Conrad, C.K., Reynolds, T., Guggino, W.B., Moss, R.B., Carter, B.J., Wine, J.J., Flotte, T.R. and Gardner, P. (1998) A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther*, **9**, 889-909.
- Wagner, J.A., Nepomuceno, I.B., Messner, A.H., Moran, M.L., Batson, E.P., Dimiceli, S., Brown, B.W., Desch, J.K., Norbash, A.M., Conrad, C.K., Guggino, W.B., Flotte, T.R., Wine, J.J., Carter, B.J., Reynolds, T.C., Moss, R.B. and Gardner, P. (2002) A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther*, **13**, 1349-1359.
- Walters, R.W., Agbandje-McKenna, M., Bowman, V.D., Moninger, T.O., Olson, N.H., Seiler, M., Chiorini, J.A., Baker, T.S. and Zabner, J. (2004) Structure of adeno-associated virus serotype 5. *J Virol*, **78**, 3361-3371.
- Walters, R.W., Pilewski, J.M., Chiorini, J.A. and Zabner, J. (2002) Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *J Biol Chem*, **277**, 23709-23713.

- Walters, R.W., Yi, S.M., Keshavjee, S., Brown, K.E., Welsh, M.J., Chiorini, J.A. and Zabner, J. (2001) Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem*, **276**, 20610-20616.
- Wang, B., Li, J. and Xiao, X. (2000a) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13714-13719.
- Wang, C., Wang, C.M., Clark, K.R. and Sferra, T.J. (2003) Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther*, **10**, 1528-1534.
- Wang, D., Fischer, H., Zhang, L., Fan, P., Ding, R.X. and Dong, J. (1999a) Efficient CFTR expression from AAV vectors packaged with promoters--the second generation. *Gene Ther*, **6**, 667-675.
- Wang, L., Nichols, T.C., Read, M.S., Bellinger, D.A. and Verma, I.M. (2000b) Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther*, **1**, 154-158.
- Wang, L., Takabe, K., Bidlingmaier, S.M., Ill, C.R. and Verma, I.M. (1999b) Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3906-3910.
- Wang, X.S., Khuntirat, B., Qing, K., Ponnazhagan, S., Kube, D.M., Zhou, S., Dwarki, V.J. and Srivastava, A. (1998) Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J Virol*, **72**, 5472-5480.
- Wang, X.S., Ponnazhagan, S. and Srivastava, A. (1996) Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol*, **70**, 1668-1677.
- Wang, X.S., Qing, K., Ponnazhagan, S. and Srivastava, A. (1997) Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J Virol*, **71**, 3077-3082.
- Wang, Y., O'Malley, B.W., Jr., Tsai, S.Y. and O'Malley, B.W. (1994) A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8180-8184.
- Wang, Y.X., Zhang, C.L., Yu, R.T., Cho, H.K., Nelson, M.C., Bayuga-Ocampo, C.R., Ham, J., Kang, H. and Evans, R.M. (2004) Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, **2**.
- Ward, P., Elias, P. and Linden, R.M. (2003) Rescue of the adeno-associated virus genome from a plasmid vector: evidence for rescue by replication. *J Virol*, **77**, 11480-11490.
- Watchko, J., O'Day, T., Wang, B., Zhou, L., Tang, Y., Li, J. and Xiao, X. (2002) Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Hum Gene Ther*, **13**, 1451-1460.

- Watson, G.L., Sayles, J.N., Chen, C., Elliger, S.S., Elliger, C.A., Raju, N.R., Kurtzman, G.J. and Podsakoff, G.M. (1998) Treatment of lysosomal storage disease in MPS VII mice using a recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther*, **5**, 1642-1649.
- Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Cherel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P. and Rolling, F. (2003) Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther*, **7**, 774-781.
- Weindler, F.W. and Heilbronn, R. (1991) A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol*, **65**, 2476-2483.
- Weiss, D.J., Baskin, G.B., Shean, M.K., Blanchard, J.L. and Kolls, J.K. (2002) Use of perflubron to enhance lung gene expression: safety and initial efficacy studies in non-human primates. *Mol Ther*, **5**, 8-15.
- Welsh, M.J. and Smith, A.E. (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, **73**, 1251-1254.
- Wen, D., Boissel, J.P., Tracy, T.E., Gruninger, R.H., Mulcahy, L.S., Czelusniak, J., Goodman, M. and Bunn, H.F. (1993) Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*, **82**, 1507-1516.
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. and Kleinschmidt, J.A. (1997) Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol*, **71**, 1341-1352.
- Wiznerowicz, M. and Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*, **77**, 8957-8961.
- Wonderling, R.S. and Owens, R.A. (1997) Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome. *J Virol*, **71**, 2528-2534.
- Wu, P., Phillips, M.I., Bui, J. and Terwilliger, E.F. (1998) Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol*, **72**, 5919-5926.
- Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. and Muzyczka, N. (2000) Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol*, **74**, 8635-8647.
- Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S.C., McCullough, B., Gao, G. and Wilson, J.M. (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol*, **73**, 3994-4003.
- Xiao, W., Warrington, K.H., Jr., Hearing, P., Hughes, J. and Muzyczka, N. (2002) Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol*, **76**, 11505-11517.

- Xiao, X., Li, J. and Samulski, R.J. (1996) Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*, **70**, 8098-8108.
- Xiao, X., Li, J. and Samulski, R.J. (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, **72**, 2224-2232.
- Xiao, X., Li, J., Tsao, Y.P., Dressman, D., Hoffman, E.P. and Watchko, J.F. (2000) Full functional rescue of a complete muscle (TA) in dystrophic hamsters by adeno-associated virus vector-directed gene therapy. *J Virol*, **74**, 1436-1442.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. and Chapman, M.S. (2002) The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10405-10410.
- Xu, L., Daly, T., Gao, C., Flotte, T.R., Song, S., Byrne, B.J., Sands, M.S. and Parker Ponder, K. (2001) CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum Gene Ther*, **12**, 563-573.
- Xu, L., Haskins, M.E., Melniczek, J.R., Gao, C., Weil, M.A., O'Malley, T.M., O'Donnell, P.A., Mazrier, H., Ellinwood, N.M., Zweigle, J., Wolfe, J.H. and Ponder, K.P. (2002) Transduction of hepatocytes after neonatal delivery of a Moloney murine leukemia virus based retroviral vector results in long-term expression of beta-glucuronidase in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Ther*, **5**, 141-153.
- Yan, Z., Zak, R., Luxton, G.W., Ritchie, T.C., Bantel-Schaal, U. and Engelhardt, J.F. (2002) Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol*, **76**, 2043-2053.
- Yang, J., Zhou, W., Zhang, Y., Zidon, T., Ritchie, T. and Engelhardt, J.F. (1999) Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J Virol*, **73**, 9468-9477.
- Ye, X., Rivera, V.M., Zoltick, P., Cerasoli, F., Jr., Schnell, M.A., Gao, G., Hughes, J.V., Gilman, M. and Wilson, J.M. (1999) Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science*, **283**, 88-91.
- Yoshida, Y., Emi, N. and Hamada, H. (1997) VSV-G-pseudotyped retroviral packaging through adenovirus-mediated inducible gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**, 379-382.
- Young, S.M., Jr., McCarty, D.M., Degtyareva, N. and Samulski, R.J. (2000) Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *J Virol*, **74**, 3953-3966.
- Young, S.M., Jr. and Samulski, R.J. (2001) Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13525-13530.
- Yuasa, K., Sakamoto, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Tanouchi, A., Yamamoto, H., Li, J., Chamberlain, J.S., Xiao, X. and Takeda, S. (2002) Adeno-associated virus vector-

- mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther*, **9**, 1576-1588.
- Zabner, J., Seiler, M., Walters, R., Kotin, R.M., Fulgeras, W., Davidson, B.L. and Chiorini, J.A. (2000) Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol*, **74**, 3852-3858.
- Zhang, L., Wang, D., Fischer, H., Fan, P.D., Widdicombe, J.H., Kan, Y.W. and Dong, J.Y. (1998) Efficient expression of CFTR function with adeno-associated virus vectors that carry shortened CFTR genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10158-10163.
- Zhang, Y., Chirmule, N., Gao, G. and Wilson, J. (2000) CD40 ligand-dependent activation of cytotoxic T lymphocytes by adeno-associated virus vectors in vivo: role of immature dendritic cells. *J Virol*, **74**, 8003-8010.
- Zhou, S., Murphy, J.E., Escobedo, J.A. and Dwarki, V.J. (1998) Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. *Gene Ther*, **5**, 665-670.
- Ziegler, R.J., Lonning, S.M., Armentano, D., Li, C., Souza, D.W., Cherry, M., Ford, C., Barbon, C.M., Desnick, R.J., Gao, G., Wilson, J.M., Peluso, R., Godwin, S., Carter, B.J., Gregory, R.J., Wadsworth, S.C. and Cheng, S.H. (2004) AAV2 vector harboring a liver-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase A and the induction of immune tolerance in Fabry mice. *Mol Ther*, **9**, 231-240.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J. and Muzyczka, N. (1999) Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther*, **6**, 973-985.
- Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. and Hope, T.J. (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*, **73**, 2886-2892.

CHENUAUD Pierre

TRANSFERT D'UN GENE RAPPORTEUR INDUCTIBLE A L'AIDE D'ADENO-ASSOCIATED VIRUSES (AAV) RECOMBINANTS DANS LE MUSCLE DE PRIMATE : AVANCEES ET LIMITES ACTUELLES.

Résumé :

Les vecteurs dérivés des *Adeno-Associated Virus* (AAV) permettent un transfert de gène à long terme *in vivo* et font figure de possibles applications cliniques. Dans cette optique, il faut pouvoir réguler l'expression du gène transféré. Le système inductible Tet-On permet de contrôler l'expression du transgène grâce à un inducteur (doxycycline). Les travaux réalisés précédemment chez le primate montraient une expression du transgène en l'absence d'inducteur et une réponse immune contre le transactivateur (Favre et al., 2002), aboutissant à la perte de l'expression du transgène. Nous avons évalué une construction améliorée du système de régulation dans le muscle squelettique de primate (macaque fascicularis), après transfert au moyen d'AAV recombinants de sérotypes 1 et 2. L'ADN complémentaire de l'érythropoïétine homologue a été utilisé comme gène rapporteur. Si l'efficacité de la régulation a été nettement améliorée, l'expression du transgène ne persiste pas chez la quasi-totalité des animaux. Mais surtout, l'érythropoïétine surexprimée par le muscle n'est pas identique à la protéine endogène et sa sécrétion à forte dose peut induire une anémie auto-immune. Cette observation est unique en transfert de gène et doit susciter des questions quant à la surexpression d'une protéine thérapeutique par un organe ectopique.

Mots clés :

Adeno-Associated Virus
Erythropoïétine
Doxycycline
Muscle
Primate
Régulation