

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**MISE AU POINT D'UNE THERAPIE GENIQUE DE LA
MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE 1 PAR DES
AAV 8 RECOMBINANTS**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : BIOLOGIE SANTÉ

Discipline : Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Présentée

et soutenue publiquement par

Maude FLAGEUL

Le 13 novembre 2009, devant le jury ci-dessous

<i>Rapporteurs</i>	Dr. LABRUNE Philippe - <i>PU-PH, Hôpital Antoine Béchère, CLAMART</i> Dr. PAGÈS Jean-Christophe - <i>PU-PH, INSERM U966, TOURS</i>
<i>Examineur</i>	Dr. MOULLIER Philippe - <i>Directeur de Recherche, INSERM U649, NANTES</i>
<i>Directeur de thèse</i>	Dr. FERRY Nicolas - <i>Directeur de Recherche, INSERM U948, NANTES</i>
<i>Co-directeur de thèse</i>	Dr. NGUYEN Tuan Huy - <i>Chargé de Recherche, INSERM U948, NANTES</i>

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
PARTIE 1 – INTRODUCTION	9
Chapitre 1 : Thérapie génique des maladies héréditaires du foie	9
I. Le foie	9
1. Anatomie.....	9
2. Histologie fonctionnelle.....	9
3. Principales fonctions hépatiques	13
3.1. Détoxification et excrétion	13
3.2. Rôles métaboliques	13
3.3. Synthèse de la bile.....	15
3.4. Immunité intra-hépatique	15
4. Régulation de la masse hépatique	17
II. Thérapie génique dans le foie	20
1. Voies de transfert de gène	20
1.1. Approche <i>ex vivo</i>	20
1.2. Approche <i>in vivo</i>	22
2. Les vecteurs synthétiques	23
3. Les vecteurs viraux	25
3.1. Adénovirus	26
3.2. Rétrovirus.....	29
3.2.1. Onco-rétrovirus	29
3.2.2. Lentivirus	31
3.3. Virus adéno-associés.....	32
III. Maladies héréditaires du foie candidates à la thérapie génique	33
1. Maladies avec conséquences hépatiques.....	33
1.1. Tyrosinémie héréditaire de type 1	34
1.2. Cholestases intrahépatiques familiales progressives	36
1.3. Déficit en α -1-antitrypsine	37
1.4. Maladie de Wilson	38
2. Maladies sans conséquences hépatiques	39
2.1. Déficit en ornithine transcarbamylase.....	41
2.2. Hypercholestérolémie familiale	43
2.3. Hémophilies	45
2.4. Maladie de Crigler-Najjar	48
Chapitre 2 : La maladie de Crigler-Najjar, un modèle pour la thérapie génique dans le foie	49
I. Le complexe <i>ugt 1</i>	49
II. Physiopathologie	50
1. Métabolisme de la bilirubine.....	50
2. Défaut de glucuroconjugaison	52
III. Traitements actuels de la maladie de Crigler-Najjar de type 1	53
1. Photothérapie	53
2. Transplantation hépatique.....	53
IV. Thérapie génique chez le rat Gunn	54
1. Utilisation de vecteurs non viraux	54
2. Utilisation de vecteurs viraux	55
2.1. Adénovirus	55
2.2. Onco-rétrovirus et lentivirus	56
2.3. AAV	57

Chapitre 3 : Les virus adéno-associés (AAV)	58
I. Génome de l'AAV sauvage	58
1. Séquences ITR	58
2. Gènes Rep et Cap	58
II. Cycle viral de l'AAV sauvage ou recombinant	60
1. AAV sauvage	60
2. AAV recombinant	61
III. Risques d'intégration et de tumorigénèse liés au vecteurs AAV	63
IV. Sérotypes et tropisme	64
V. Production d'AAV recombinants	66
VI. Stratégies d'amélioration des vecteurs AAV	66
1. Changements au niveau de la capsid	67
1.1. Pseudotypage	68
1.2. AAV mosaïque ou chimérique	68
1.3. Re-ciblage	69
2. Technique de trans-épissage	69
3. AAV « self complementary » (AAVsc)	70
VII. Risques de réaction immunitaire contre les vecteurs AAV	73
1. Contre le produit du transgène	73
2. Contre la capsid virale	74
VIII. Principaux protocoles de thérapie génique utilisant des AAVr	75
1. Mucoviscidose	75
2. Hémophilie B	76
3. Pathologies rétinienues	76
4. Atteintes du système nerveux central	77

OBJECTIFS DE LA THESE 79

PARTIE 2 - RÉSULTATS : THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE 1 PAR DES AAV RECOMBINANTS..... 81

Chapitre 1 : Expression des vecteurs AAV chez le jeune rat	81
I. Introduction	81
II. Injection de vecteurs codant l'UGT1A1	82
1. Dosage de la bilirubine dans le sérum	82
2. PCR quantitatives sur foie total	84
3. Immunohistochimie	84
III. Injection de vecteurs codant la β -galactosidase d'Escherichia Coli	85
1. Etude sur foie total	85
1.1. Coloration Xgal et immunohistochimie	85
1.2. Mesure de l'efficacité de transduction dans le foie	87
1.3. Southern blot	88
2. Etude des zones exprimant ou non la β -galactosidase	90
2.1. Dissection de zones positives ou négatives en Xgal	90
2.2. PCR quantitatives	91
2.3. Lam-PCR	92
Chapitre 2 : Etude des risques liés à l'intégration des vecteurs AAV dans le foie de rats nouveau-nés	95
I. Introduction	95
II. Protocole expérimental	96
III. Résultats	97
1. Observation macroscopique du foie après traitement au 2-AAF	97
2. Coloration Xgal du foie	98
3. Immunohistochimie	102
3.1. Détection des nodules prénéoplasiques dans le foie	102
3.2. Marquage des cellules exprimant la β -galactosidase	103
3.3. Co-localisation des marquages GST-P et β -galactosidase	103
IV. Conclusion	106

Chapitre 3 : Utilisation de vecteurs AAVsc pour le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 chez le rat Gunn adulte	108
I. Introduction	108
II. Protocole expérimental	108
III. Résultats.....	109
1. Dosage de la bilirubine dans le sérum.....	110
2. Comparaison entre le taux de bilirubine sérique et l'activité enzymatique dans le foie au sacrifice ..	112
3. PCR quantitatives	113
4. Présence de dérivés conjugués dans la bile.....	114
5. Dosage d'anticorps anti-UGT1A1 dans le sérum	115
6. Immunohistochimie	116
IV. Conclusion.....	117
 DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	119
 ANNEXE I - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	126
 ANNEXE II - AUTRES ARTICLES	131
 BIBLIOGRAPHIE	132

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-AAF	2-acétylaminofluorène
AAT	α -1-antitrypsine
AAV	virus adéno-associé
AAVr	AAV recombinant (ou vecteur AAV)
AAVsc	AAV « self-complementary » (ou auto-complémentaire)
AAVS1	adeno-associated virus integration site 1
ABC	ATP-binding cassette
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BMI1	B cell-specific Moloney-MLV integration site 1
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
DAB	3,3'-diaminobenzidine
db / sb	double brin / simple brin
DEN	diéthylnitrosamine
DO	densité optique
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAH	fumaryl acétoacétate hydrolase
FGF	fibroblast growth factor
GFP	green fluorescent protein
GLUT-2	glucose transporter-2
GST-P	glutathione S-transferase placentaire
HGF	hepatocyte growth factor
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
IEE	integration efficiency element
IL	interleukine

ITR	séquence terminale répétée inversée
kb	kilobase
Lam-PCR	linear amplification-mediated PCR
LDL	low-density lipoprotein
LMO-2	LIM domain only-2
LP1	lipoprotéine hépatique
LPS	lipopolysaccharide
LTR	séquence terminale longue répétée
MDR	multidrug resistance
MPS	mucopolysaccharidose
mTTR	murin transthyretin
nls	nuclear localisation signal
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluoro-methylbenzoyl)-1,3-cyclohexedione
ORF	open reading frame
OTC	ornithine trans carbamylase
pA	polyadénylation
PCR	polymerase chain reaction
PFIC	cholestase intra hépatique familiale progressive
pi	particule infectieuse
pv	particule virale
qPCR	PCR quantitative
RBS	rep binding site
RPE65	RPE65 : retinal pigment epithelium 65
RISC	RNA-induced silencing complex
SCID	déficit immunitaire combiné sévère
TGF-β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRS	terminal resolution site
tx	mutation « toxic milk »
UGT1A1	UDP-glucuronosyltransferase de type 1
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
WPRE	woodchuck post regulatory element
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1. Structure tridimensionnelle d'un lobule hépatique.....	10
Figure 2. Fenestrations de l'endothélium hépatique.....	12
Figure 3. Equilibre entre tolérance et immunité dans le foie.....	17
Figure 4. Cellules et facteurs impliqués dans la régénération du foie après une hépatectomie partielle.....	19
Figure 5. Génome de l'adénovirus sauvage de type 5 et des différentes générations d'adénovirus recombinants utilisables en thérapie génique.....	27
Figure 6. Génomes d'un onco-rétrovirus et d'un lentivirus.....	30
Figure 7. Pourcentages de transduction hépatocytaire nécessaires à la correction phénotypique de différentes maladies métaboliques.....	40
Figure 8. Organisation du complexe multigénique ugt 1.....	50
Figure 9. Métabolisme de la bilirubine.....	51
Figure 10. Génome de l'AAV sauvage (A) ou recombinant (B), et structure d'une séquence ITR (C).....	59
Figure 11. Cycle viral de l'AAV sauvage ou recombinant.....	60
Figure 12. Structures moléculaires de l'AAV recombinant.....	62
Figure 13. Intégration possible des AAV recombinants dans le génome de leur cellule-hôte.....	64
Figure 14. Techniques d'amélioration des vecteurs AAV par modification de la capsid.....	67
Figure 15. Comparaison entre AAV sb et AAVsc.....	72
Figure 16. Suivi de la bilirubinémie dans le sérum de rats Gunn injectés à 2 ou 14 jours avec des vecteurs AAV 2/8 CMV UGT1A1.....	83
Figure 17. Coloration hémalum / phloxine sur du foie de rats injectés à J2 ou J14 par des vecteurs AAV 2/8 CMV UGT1A1.....	84
Figure 18. Détection d'anticorps anti-β-galactosidase par test ELISA.....	86
Figure 19. Détection de l'activité β-galactosidase par coloration Xgal et immunohistochimie.....	87
Figure 20. Analyse par Southern blot sur le foie total.....	89
Figure 21. Macrodissection d'une zone positive à 3 mois.....	90
Figure 22. Localisation des sites d'intégration AAV sur le chromosome 1 du rat.....	93
Figure 23. Représentation schématique des conditions expérimentales.....	97
Figure 24. Répartition des animaux dans chaque groupe selon l'aspect macroscopique du foie après le régime utilisant le 2-AAF.....	98
Figure 25. Aspect macroscopique du foie au sacrifice.....	98
Figure 26. Observation du foie coloré en Xgal sous loupe binoculaire.....	99
Figure 27. Tests ELISA dans le sérum des rats négatifs en Xgal.....	101
Figure 28. Marquage d'un nodule prénéoplasique dans le foie.....	102
Figure 29. Co-localisation des marquages anti GST-P et β-galactosidase dans le foie.....	104
Figure 30. Observation d'un clone AAV positif en GST-P et en β-galactosidase.....	105
Figure 31. Suivi de la bilirubinémie dans le sérum.....	110
Figure 32. Proportion de dérivés conjugués dans la bile de rats Gunn ayant reçu des AAVsc codant l'UGT1A1.....	115
Figure 33. Détection d'anticorps dirigés contre l'UGT1A1 humaine.....	116
Figure 34. Coloration hémalum / phloxine sur du foie de rats injectés par des AAVsc codant l'UGT1A1.....	117

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales caractéristiques des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.....	25
Tableau 2. Principales maladies hépatiques héréditaires candidates pour la thérapie génique ayant des conséquences sur le foie.....	34
Tableau 3. Principales maladies hépatiques héréditaires sans conséquences histologiques sur le foie, et candidates à la thérapie génique.....	41
Tableau 4. Tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique.....	65
Tableau 5. Efficacité de transduction dans le foie à 7 jours, 1 mois et 3 mois post injection.....	88
Tableau 6. Echantillons macrodiséqués sous loupe binoculaire et inclus dans l'analyse par qPCR.....	91
Tableau 7. PCR quantitatives sur les zones positives ou négatives en β-galactosidase.....	91
Tableau 8. Caractérisation moléculaire des phénomènes intégratifs dans 3 clusters des rats 012 et 014 à 1 mois post injection par Lam-PCR.....	92

Tableau 9. Coloration Xgal et aspect macroscopique du foie au sacrifice	100
Tableau 10. Répartition des cellules positives en β -galactosidase.....	103
Tableau 11. Groupes inclus dans l'étude	109
Tableau 12. Comparaison entre le taux de bilirubine sérique et l'activité enzymatique dans le foie au sacrifice	113
Tableau 13. PCR quantitatives sur le foie de rats Gunn injectés par des AAVsc codant l'UGT1A1	114

PARTIE 1 – INTRODUCTION

Chapitre 1 : Thérapie génique des maladies héréditaires du foie

I. Le foie

1. Anatomie

Le foie est un organe intrapéritonéal situé sous le diaphragme et traversant la cavité abdominale sur toute sa largeur. C'est l'organe le plus volumineux et le plus vascularisé de l'organisme. Son poids peut atteindre jusqu'à 2 kg, dont 800g de sang, chez l'homme adulte. Le foie est entouré d'une membrane conjonctive, la capsule de Glisson. Il est constitué de 2 lobes principaux - gauche et droit - séparés par le ligament falciforme.

Le foie possède deux systèmes de circulation sanguine : systémique et porte. La vascularisation systémique, via l'artère hépatique, apporte le sang oxygéné à partir du tronc cœliaque. Le système porte draine le sang veineux, riche en nutriments provenant de l'intestin. Il représente à lui seul 75% du débit sanguin hépatique. Un autre système vasculaire permet la synthèse et l'excrétion de la bile vers le duodénum.

2. Histologie fonctionnelle

L'unité de structure morphologique du foie est le lobule hépatique (Figure 1). De forme hexagonale, il mesure 0.7mm dans sa plus grande largeur et 2mm de longueur. Les lobules sont séparés entre eux par des structures conjonctives appelées espaces de Kiernan, ou espaces portes. Au niveau de ces espaces, l'association entre une branche de la veine porte, un canal biliaire et une branche de l'artère hépatique forme la triade portale. Chaque lobule s'organise autour d'une veine centrolobulaire (branche de la veine hépatique), et contient trois types de structures : les travées de Remak, les capillaires radiés (ou sinusoides) et les canalicules biliaires.

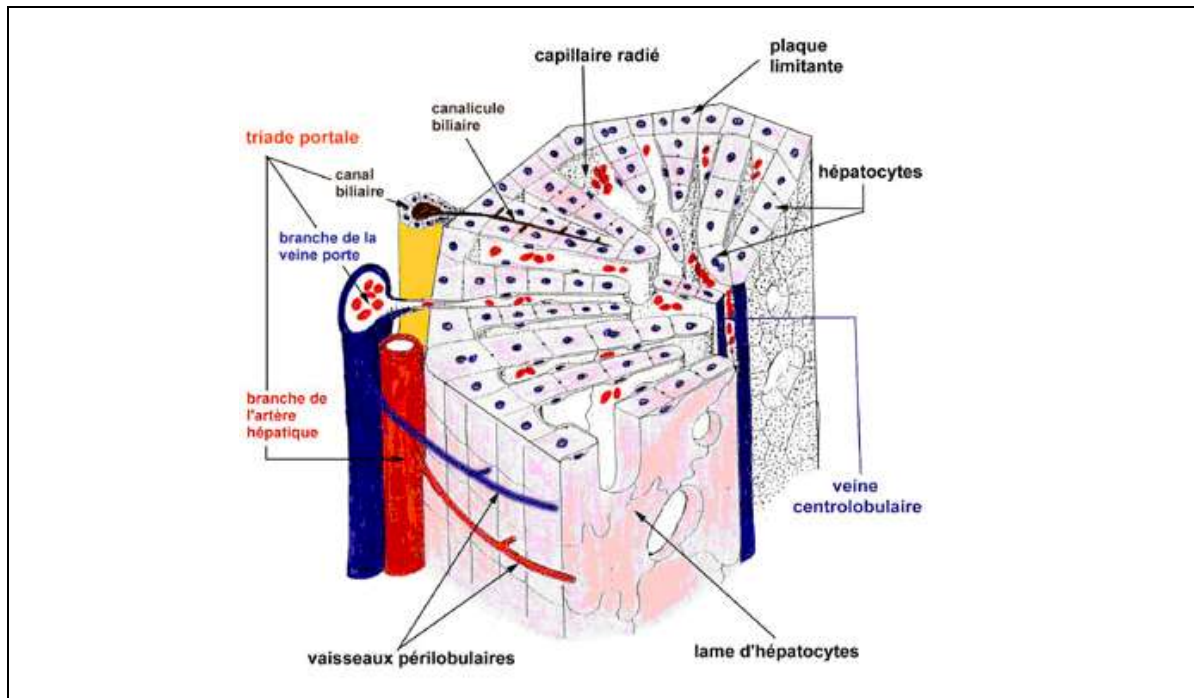


Figure 1. Structure tridimensionnelle d'un lobule hépatique (N. Vacheret, Université Claude Bernard, Lyon). Le lobule hépatique est organisé autour d'une veine centrolobulaire, à partir de laquelle rayonnent les travées d'hépatocytes. Les lobules hépatiques sont séparés entre eux par les espaces portes, contenant chacun une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique, et un canal biliaire.

Les travées de Remak contiennent les hépatocytes, qui représentent environ 60% des cellules hépatiques et 85% de la masse totale du foie. Les hépatocytes ont la particularité de pouvoir être pluriploïdes. Chez le rat nouveau-né, tous les hépatocytes sont diploïdes. Le phénomène de polyploïdisation intervient après le sevrage. À l'âge adulte on observe en moyenne 10, 70 et 20% d'hépatocytes diploïdes, tétraploïdes, ou octoploïdes. Tandis qu'à la naissance, tous les hépatocytes sont mononucléés, chez l'adulte on dénombre environ 20 à 30% de cellules binucléées parmi les polyploïdes. Chez l'Homme adulte, environ 20 à 30% des hépatocytes sont polyploïdes, et parmi ces cellules, 30 à 40% contiennent deux noyaux ou plus (Gupta *et al.*, 2000 ; Guidotti *et al.*, 2003).

Les hépatocytes sont de forme polyédrique. Ils contiennent de nombreux organites intracellulaires, témoins d'une grande activité métabolique. Ils ont une fonction endocrine, la libération de composés dans le sang, et une fonction exocrine, la sécrétion de bile.

Les travées de Remak rayonnent à partir du centre du lobule et sont séparées des capillaires radiés par l'espace de Disse. Les capillaires radiés contiennent les cellules

endothéliales et les cellules de Kupffer. Les cellules endothéliales forment une structure fenêtrée, qui joue un rôle de filtre entre la lumière sinusoïdale et l'espace de Disse, et permettent le passage sélectif des nutriments et des macromolécules circulantes du sang vers les hépatocytes. Le diamètre et la fréquence des fenestrations endothéliales diffèrent selon les espèces. Chez l'Homme, leur diamètre est compris entre 50 à 300 nm de diamètre, contre 100 nm environ chez le rat (Figure 2). Ces paramètres peuvent varier entre les individus d'une même espèce, et sont également modulables selon certaines conditions expérimentales telles qu'une hyperpression chirurgicale, ou la prise de certains médicaments et drogues (Smedsrød *et al.*, 1994).

Les cellules de Kupffer représentent 5 à 10% du poids du foie et environ 35% des cellules hépatiques. Elles sont de forme irrégulière, avec des extensions cytoplasmiques. On les trouve principalement dans la lumière des sinusoides, parfois aussi dans l'espace de Disse. Elles appartiennent à la famille des macrophages mononucléés, et contiennent de nombreux phagosomes et lysosomes, dus à leur fonction d'endocytose. Elles jouent également un rôle important dans l'immunité du foie.

Les cellules périsinusoïdales, encore appelées cellules étoilées ou de Ito, sont situées dans l'espace de Disse, entre les cellules endothéliales et les hépatocytes. Leurs propriétés contractiles permettent la régulation du flux sanguin dans les sinusoides. Ces cellules sont également responsables de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire dans l'espace périsinusoïdal, et assurent le stockage de la vitamine A. Enfin, elles jouent un rôle dans la fibrogenèse, notamment dans des cas pathologiques de fibrose hépatique.

Les canalicules biliaires sont issus de la jonction entre deux hépatocytes adjacents, et ne sont pas formés de cellules propres. Ces canalicules convergent pour former les ductules biliaires, arrivent dans le passage de Hering, puis rejoignent les canaux biliaires des espaces portes, composés de cellules biliaires. La circulation de la bile s'effectue donc de façon centrifuge, des hépatocytes vers les canaux biliaires des espaces portes. La circulation sanguine intra-hépatique s'effectue en sens inverse, de façon centripète, depuis les espaces portes vers la veine centrolobulaire.

Il est à noter que la notion de lobule hépatique se base plus sur une organisation structurale que fonctionnelle du foie. Il existe un autre système d'organisation hépatique, l'acinus, qui tient compte des fonctions hépatiques. Cette structure est répartie autour de la zone périportale, qui devient centrale. Le périmètre de l'acinus est alors une ligne imaginaire reliant les veines centrolobulaires voisines.

A.

Espèce	Diamètre (nm)	Nombre de fenestrations / μm^2
Rat	98.0 ± 13.0	20.0 ± 6.3
Souris	99.0 ± 18.0	14.0 ± 5.0
Lapin	59.4 ± 4.8	17.3 ± 3.8
Poulet	89.6 ± 17.8	2.9 ± 0.3
Babouin	92 – 116	1.4 – 1.9
Homme	50 – 300	15 – 25

B.

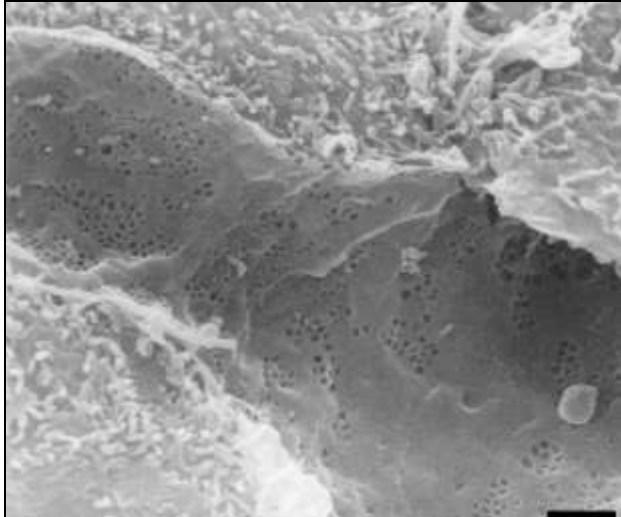


Figure 2. Fenestrations de l'endothélium hépatique (d'après Braet et Wisse, 2002). Les caractéristiques des fenestrations endothéliales de différentes espèces sont notées dans le tableau A. Le nombre et le diamètre des fenestrations sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, exceptés pour le babouin et l'homme, où les valeurs minimales et maximales sont indiquées. On peut noter une très grande variabilité inter-espèce. La photo B montre les fenestrations endothéliales d'un foie de rat par microscopie électronique (échelle : 1 μm).

3. Principales fonctions hépatiques

Le foie assure de nombreuses fonctions vitales pour l'organisme, qui peuvent être regroupées en quatre grandes catégories :

- la détoxification et l'excrétion de composés néfastes pour l'organisme
- le métabolisme des glucides, lipides et protéines
- un rôle dans la digestion, notamment par la production de bile
- une fonction immunitaire importante

3.1. Détoxification et excrétion

Le foie est un grand réservoir contenant en permanence 10% du volume total sanguin. Il reçoit environ 1500 ml de sang par minute, essentiellement par la veine porte. Ce sang est riche en nutriments et toxines issus des intestins. Il est filtré au niveau des hépatocytes et des cellules endothéliales, ce qui permet l'élimination de composés toxiques, dès leur premier passage. C'est la clairance hépatique, qui se décompose en deux étapes : la métabolisation des composés, et ensuite leur élimination via la voie biliaire ou sanguine. Après excrétion dans la bile, le composé se retrouve dans la lumière intestinale, d'où il peut être réabsorbé par le foie, par le cycle entéro-hépatique. Un autre système d'élimination des composés toxiques est assuré par les cellules de Kupffer, qui phagocytent les bactéries et les hématies sénescents.

3.2. Rôles métaboliques

Le foie joue un rôle central dans la régulation de la glycémie. En cas d'hyperglycémie, le glucose sanguin en excès est capté par les hépatocytes au niveau des récepteurs GLUT-2 (glucose transporter-2), puis polymérisé et stocké sous forme de glycogène. Cette réaction de glyconéogenèse est stimulée par l'insuline, une hormone synthétisée par les cellules β -pancréatiques. En cas d'hypoglycémie, le phénomène de glycogénolyse permet la production de glucose à partir du glycogène stocké dans le foie. Cette synthèse est stimulée par le glucagon, une enzyme produite au niveau des cellules α -

pancréatiques. Le glucose ainsi formé est ensuite relargué dans la circulation sanguine via le récepteur GLUT-2. Ainsi, le foie assure le maintien de l'homéostasie glucidique.

Le foie joue également un rôle important dans le métabolisme lipidique. En période postprandiale, les lipides sont absorbés au niveau de l'intestin, puis transportés dans la circulation sanguine grâce à des lipoprotéines appelées chylomicrons. Les acides gras issus de ces lipides rejoignent le tissu adipeux, où ils sont stockés sous forme de graisses. Le reste des lipides alimentaires atteint le foie, principalement sous forme de cholestérol. En période de jeûne, ces acides gras peuvent également être captés par le muscle afin de produire de l'énergie. En période interprandiale, une partie des acides gras issus du tissu adipeux est captée par le foie, où leur oxydation permet la production d'énergie. Ils peuvent également être transformés en triglycérides ou corps cétoniques. Ceci dépend de la concentration plasmatique en insuline. En cas d'insulinémie faible, la production de corps cétoniques est favorisée. Ils sont alors relargués et oxydés dans la circulation systémique. Lorsque le taux d'insuline dans le sang est élevé, il y a une production accrue de triglycérides, qui sont ensuite stockés ou redistribués vers les muscles et le tissu adipeux. Dans de rares cas pathologiques, tels qu'une surcharge en hydrates de carbone ou une suralimentation, le foie peut également synthétiser des acides gras directement à partir de glucose.

Les acides aminés provenant de l'intestin sont captés par le foie, et servent à la synthèse de protéines hépatiques ou circulantes telles que l'albumine, le fibrinogène, des facteurs de coagulation, des médicaments et des hormones. Cette synthèse est activée par l'insuline et par des concentrations élevées en acides aminés. Elle est inhibée par le glucagon. Il n'y a pas de stockage des acides aminés en excès. Leur dégradation dans le foie permet de récupérer le squelette carbone, qui est transformé en glucose puis utilisé dans la néoglucogenèse. Les acides aminés peuvent également servir à la production d'énergie, après suppression de leur fonction amine. C'est le cycle de l'urée, qui permet l'élimination d'ammoniaque et de bicarbonates, assurant ainsi le maintien de l'équilibre acido-basique de l'organisme.

Le foie joue également un rôle important dans le métabolisme du fer. L'absorption du fer s'effectue au niveau de l'intestin, et provient soit de l'alimentation, soit de la dégradation des hématies sénescents par les macrophages circulants (ou

érythrophagocytose). Un excès en fer est toxique pour l'organisme, car son association avec l'oxygène forme des radicaux libres, pouvant détruire les membranes cellulaires. L'enzyme responsable du maintien de l'homéostasie du fer dans l'organisme est l'hepcidine. Son précurseur est synthétisé dans le foie, puis l'enzyme active est relarguée dans la circulation sanguine, pour atteindre les entérocytes et contrôler la réabsorption intestinale de fer. Une seconde enzyme du métabolisme du fer, la ferritine, ou transferrine, est également synthétisée par le foie. Elle se fixe au fer libre dans le sérum, empêchant la formation de radicaux libres, et permettant également son stockage. Il n'existe pas de système permettant la dégradation du fer en excès de l'organisme.

3.3. Synthèse de la bile

La bile est une sécrétion exocrine du foie, qui en produit 0.5 à 1 litre par jour. Elle est synthétisée au niveau des hépatocytes, puis déversée dans les canaux biliaires au niveau des espaces portes, après un passage dans un système de canalicules. La circulation biliaire s'effectue de façon centrifuge, donc en sens opposé au flux sanguin. La bile hépatique est constituée majoritairement d'eau (97%), ainsi que d'électrolytes, de sels et acides biliaires, de phospholipides, de cholestérol, et de déchets. Elle contient également des pigments tels que la bilirubine.

Les principaux rôles de la bile sont :

- la neutralisation du chyme gastrique acide, grâce à ses ions bicarbonate
- la formation de micelles par le phénomène d'émulsion, ce qui permet la digestion des graisses par la lipase pancréatique
- l'absorption des lipides par l'intestin grêle.

3.4. Immunité intra-hépatique

Le sang issu du tractus gastro-intestinal arrive au foie à travers les sinusoides hépatiques en apportant des substances potentiellement toxiques et antigéniques. Ces composés sont principalement l'endotoxine et d'autres composants bactériens provenant de l'intestin, des antigènes alimentaires, ou de cellules modifiées par des virus. Le foie

contient environ 10^{10} cellules immunocompétentes, que l'on peut regrouper en deux catégories : les cellules lymphoïdes (cellules natural killer, lymphocytes T et B), et les cellules présentatrices d'antigène (cellules endothéliales sinusoidales, dendritiques ou de Kupffer), et permet la défense de l'organisme contre ces substances néfastes (Ballot *et al.*, 2003).

Il existe un équilibre constant entre le maintien de la tolérance hépatique ou le déclenchement d'une réponse immunitaire (Figure 3). Dans l'organisme, les lymphocytes T CD8+ naïfs sont activés indépendamment au niveau du foie et des nodules lymphatiques. La compétition entre ces deux sites est fonction de la charge antigénique, de l'affinité des cellules T pour les antigènes en question, et du tropisme viral (dans le cas d'une infection virale). Le programme de différenciation lymphocytaire est différent dans les deux sites, mais les mécanismes mis en jeu sont étroitement liés.

Dans les nodules lymphatiques, les lymphocytes T CD8+ naïfs sont activés par les cellules dendritiques, puis mûrissent en lymphocytes T cytotoxiques. Ils sont ensuite capables de migrer vers le parenchyme hépatique, où ils déclenchent une réponse immunitaire contre l'antigène étranger. En outre, certaines de ces cellules T vont pouvoir mûrir en cellules effectrices ou mémoires (Figure 3a).

Au contraire, en absence d'inflammation les cellules T CD8+ naïves peuvent être activées directement au niveau du foie par les hépatocytes, les cellules endothéliales des sinusoides ou les cellules de Kupffer. Ces lymphocytes T acquièrent une fonction cytotoxique incomplète qui permet le déclenchement d'une réponse immunitaire inefficace, aboutissant au phénomène de tolérance (Figure 3b).

Enfin, une inflammation hépatique préexistante peut conduire à l'altération de la fonction présentatrice d'antigène de certaines cellules du foie. Ces cellules présentatrices, normalement tolérogènes, deviennent immunogènes. Elles permettent le recrutement de cellules T, et le déclenchement d'une réponse immune intrahépatique efficace (Figure 3 c).

L'existence d'une immunité intra-hépatique est un paramètre à prendre en compte lors des essais de thérapie génique ciblant le foie. En effet, il existe un risque de réponse immune soit contre la protéine thérapeutique, soit contre le vecteur lui-même, qui est le plus souvent dérivé de virus.

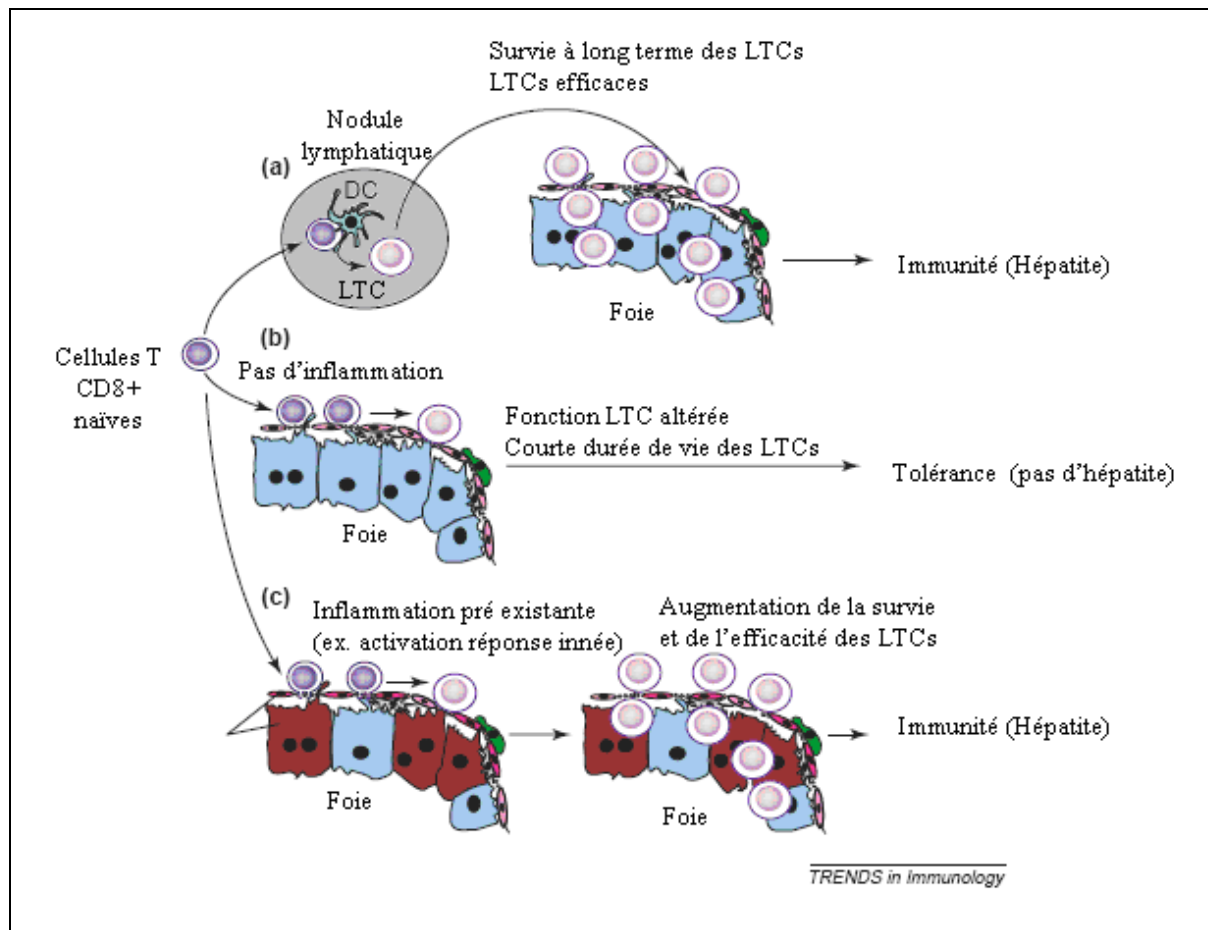


Figure 3. Equilibre entre tolérance et immunité dans le foie (d'après Bowen et al., 2005).

Les lymphocytes T naïfs sont activés au niveau des nodules lymphatiques par les cellules dendritiques. Ils rejoignent ensuite le foie par migration transendothéliale, où ils peuvent déclencher une hépatite en réponse à un antigène étranger (a). En absence d'inflammation, les lymphocytes T naïfs peuvent être activés directement au niveau du foie. Leur fonction cytotoxique est altérée, conduisant au phénomène de tolérance (b). Dans le cas d'une inflammation pré-existante, certaines cellules hépatiques perdent leur caractère tolérogène et activent le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques au niveau du foie, provoquant ainsi une hépatite (c).

DC : cellule dendritique, LTC : lymphocyte T cytotoxique

4. Régulation de la masse hépatique

Le foie peut ajuster sa masse totale en fonction de signaux de régulation positifs ou négatifs. Ainsi, en cas de transplantation, un foie trop volumineux peut diminuer sa masse afin de s'adapter à l'organisme receveur. Inversement, les cellules du foie peuvent proliférer pour combler la perte d'une partie de l'organe (Michalopoulos, 1997 et 2007).

Ce phénomène a été décrit chez le rat, par Higgins et Anderson, grâce au modèle d'hépatectomie partielle ou hépatectomie des deux-tiers (Higgins et Anderson, 1931).

Chez le rat, il a été montré que la transplantation d'un foie de petite taille induisait une rapide prolifération hépatocytaire permettant une récupération de la masse hépatique normale en 1 à 2 semaines. (Francavilla et al., 1994). Cela a été également observé chez l'Homme, car souvent les greffons disponibles sont plus petits que la taille adaptée à l'organisme receveur. Par conséquent, les greffons augmentent de taille rapidement après la transplantation, jusqu'à atteindre un volume équivalent à celui attendu. Aucune relation particulière n'a été mise en évidence entre cette croissance hépatique et les variations des taux plasmatiques en acides aminés, glucagon, et insuline (Van Thiel et al., 1987). D'autres expérimentations plus récentes ont montré une intervention précoce du facteur de croissance HGF (hepatocyte growth factor), puis du TGF- β 1 (transforming growth factor β 1). Ce dernier facteur contrôle la taille du greffon, empêchant ainsi une prolifération excessive des hépatocytes (Ninomiya et al, 2003).

Contrairement à d'autres tissus tels que la peau et la moelle osseuse, la régénération hépatique n'implique pas de cellules souches, mais principalement des hépatocytes matures. Il existe toutefois des cellules souches hépatiques, qui interviennent uniquement si la prolifération hépatocytaire est bloquée. En conditions normales, la régénération hépatique s'effectue grâce à la croissance des lobes résiduels. Dans un foie sain adulte, seuls 0.01 à 0.1% des hépatocytes sont en mitose. Ce sont des cellules différenciées, mais possédant une forte capacité d'auto-renouvellement. Il est ainsi possible de pratiquer plus de 12 hépatectomies partielles successives chez le rat, en observant une régénération totale de la masse hépatique entre chaque chirurgie (Stöcker *et al.*, 1973).

Dans le modèle d'hépatectomie partielle chez le rat, un premier pic de synthèse d'ADN est observé à 24h, et est dû à la prolifération des hépatocytes matures. Les autres types cellulaires (épithéliales biliaires, endothéliales, de Kupffer et de Ito) jouent un rôle plus tardif, avec un pic secondaire entre 36 et 48h (Figure 4A). Les cellules hépatiques non-parenchymales, stimulées par des facteurs tels que le lipopolysaccharide, activent ensuite l'entrée des hépatocytes dans le cycle cellulaire. D'autres facteurs, synthétisés par des organes extra-hépatiques tels que la thyroïde, le pancréas, les glandes surrénales et le

duodénum, interviennent également. Ceci conduit à une synthèse d'ADN dans les hépatocytes, permettant la régénération du foie (Figure 4B).

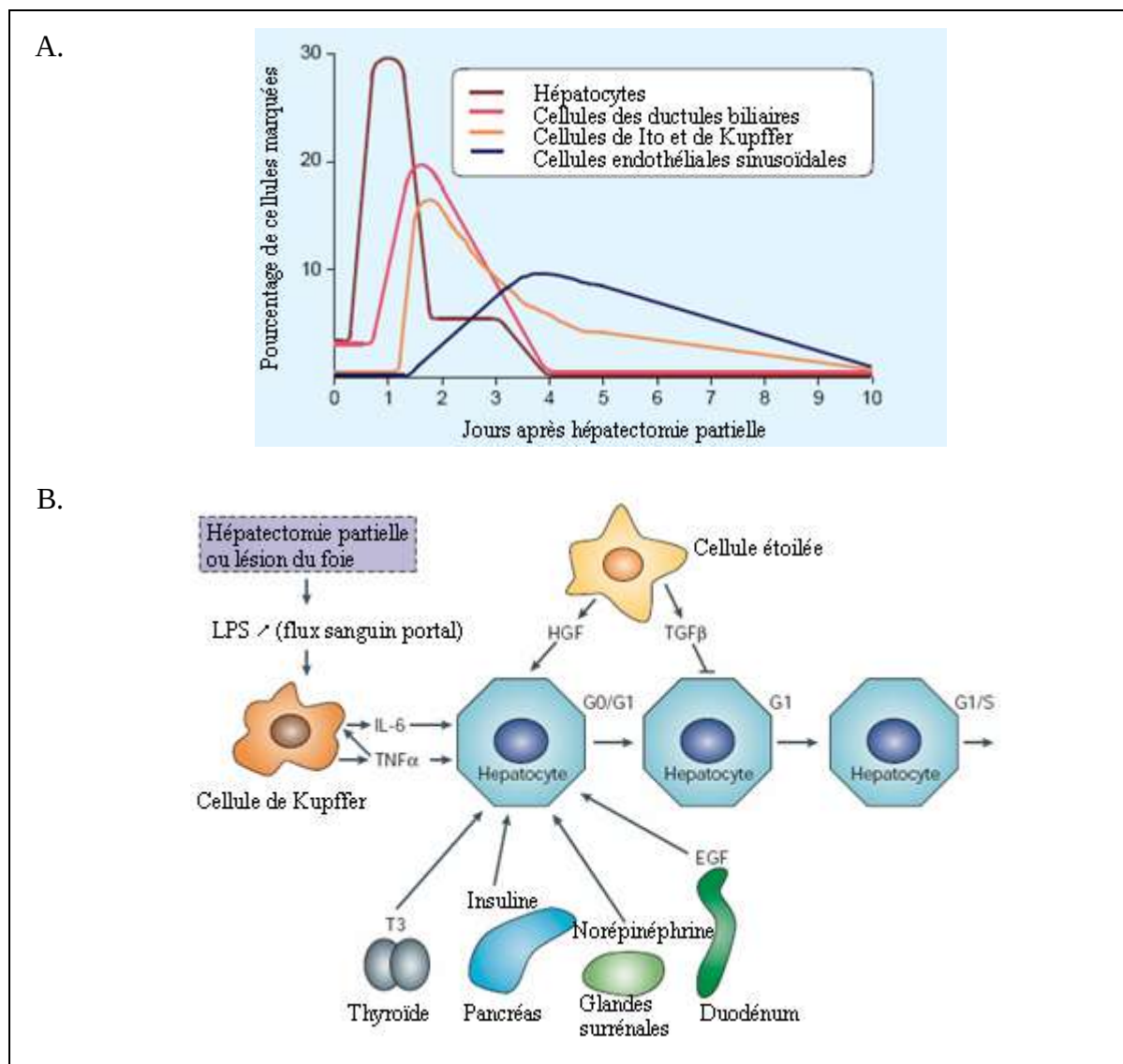


Figure 4. Cellules et facteurs impliqués dans la régénération du foie après une hépatectomie partielle chez le rat (d'après Michalopoulos 1997 et Taub 2004). Un premier pic de synthèse d'ADN apparaît à 24h pour les hépatocytes, et plus tardivement dans les autres types cellulaires (A). Les facteurs de croissance et cytokines principalement impliqués sont l'hépatocyte growth factor (HGF), le transforming growth factor β (TGF-β), l'interleukine-6 (IL-6), le tumor necrosis factor α (TNF- α), l'insuline et la norépinéphrine. Ils sont libérés par les cellules de Kupffer et les cellules étoilées, ainsi que par d'autres organes extra-hépatiques tels que la thyroïde, le pancréas, les glandes surrénales et le duodénum (B).

EGF : epidermal growth factor ; HGF : hepatocyte growth factor ; IL-6 : interleukin 6 ; LPS : lipopolysaccharide ; T3 : triiodothyronine ; TGFβ : transforming growth factor β ; TNFα : tumour necrosis factor α

II. Thérapie génique dans le foie

Le foie apparaît comme une cible pertinente pour la thérapie génique, non seulement grâce à ses propriétés régénératives, mais aussi car :

- L'expression et la régulation de nombreux gènes impliqués dans des voies métaboliques s'effectuent au niveau des hépatocytes. Ces gènes sont la cible de nombreuses mutations, conduisant à des maladies métaboliques graves. Ces pathologies sont potentiellement candidates pour des essais de thérapie génique.
- Grâce à la très grande vascularisation du foie, toute particule injectée dans la circulation systémique se retrouve rapidement captée par le foie.
- Les fenestrations de son endothélium permettent l'entrée de macromolécules circulantes telles que des particules virales.

La plupart des maladies hépatiques héréditaires sont monogéniques et sont donc des candidates potentielles à la thérapie génique, qui va consister à apporter une copie fonctionnelle du gène déficient au sein des hépatocytes malades. Deux types d'approches sont possibles, *ex vivo* ou *in vivo*, présentant chacune des avantages et des inconvénients (Ferry, 2003).

1. Voies de transfert de gène

1.1. Approche *ex vivo*

Dans le cas d'un transfert de gène *ex vivo*, les cellules sont prélevées chez le patient puis mises en culture et modifiées génétiquement par un vecteur portant le gène d'intérêt. Les cellules transduites sont ensuite ré administrées au malade.

Le principal inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite le prélèvement et la mise en culture des cellules à transduire. Ceci n'est pas toujours faisable, comme pour les neurones par exemple, mais c'est par contre possible pour les cellules de la moelle osseuse, de la peau, des muscles ou du foie. C'est également difficile en cas d'une atteinte

multi organes, ou quand les cellules malades sont disséminées dans tout l'organisme. De plus, la transduction va se limiter au nombre de cellules mises en culture, contrairement à la stratégie *in vivo* qui permet potentiellement la transduction de tout un organe. Ceci est vrai pour les maladies musculaires par exemple. Ce n'est pas toujours le cas pour les atteintes hépatiques, car dans certains cas la réinjection de cellules modifiées *ex vivo* peut induire un avantage sélectif aboutissant au repeuplement de tout le foie.

La stratégie *ex vivo* présente cependant de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet une estimation assez précise du nombre de cellules positives et de l'intensité d'expression. Elle permet également de cibler l'expression du transgène à un type cellulaire donné, empêchant sa dissémination dans d'autres organes tels que les gonades, et limitant également le risque de réponse immune.

Le premier essai clinique de thérapie génique autorisé était basé sur une stratégie *ex vivo* chez deux fillettes atteintes de déficit immunitaire combiné sévère du à une mutation dans le gène codant l'adénosine désaminase (ADA-SCID). Cette enzyme joue un rôle dans le métabolisme des purines. En son absence, il y a accumulation de désoxyadénosine, qui est ensuite transformée en désoxyadénosine triphosphate, une substance toxique, au niveau des cellules immunitaires T. L'essai de thérapie génique consistait à transduire les lymphocytes T des patients avec des vecteurs onco-rétroviraux portant l'ADNc du gène codant l'adénosine désaminase (Blaese *et al.*, 1995). Cette étude établit la preuve de principe de l'efficacité de l'approche *ex vivo*, qui fut par la suite testée dans de nombreuses autres pathologies, comme les maladies métaboliques. Celles qui peuvent être candidates pour des essais de thérapie génique *ex vivo* sont celles qui ne nécessitent pas une régulation précise du transgène dans l'organisme, et qui ont une histologie du foie normale afin de permettre l'isolement des hépatocytes puis leur réinjection chez le malade. En cas de pathologie conduisant à des lésions hépatiques, il faudra traiter les patients le plus tôt possible (Nguyen *et al.*, 2009).

Le premier essai de thérapie génique pour une maladie du foie fut réalisé en 1992 par l'équipe du Dr Wilson. Ce fut un succès en terme de faisabilité, cependant son efficacité thérapeutique fut décevante. Il s'agissait d'une approche *ex vivo* pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale, grâce à l'utilisation des vecteurs rétroviraux codant le récepteur aux LDL (Grossman *et al.*, 1994).

Malgré des résultats encourageants, les protocoles mis en œuvre dans les essais *ex vivo* peuvent être assez lourds, à cause notamment de l'étape de culture cellulaire. Une autre approche consiste à injecter directement les vecteurs chez le patient. C'est la stratégie *in vivo*.

1.2. Approche *in vivo*

Dans le cas d'un transfert de gène *in vivo*, il n'y a pas d'étape de culture. Les vecteurs sont administrés directement chez le patient ce qui rend cette approche potentiellement applicable à tout type de maladie génétique, même les atteintes nerveuses par exemple. L'inconvénient majeur de cette approche est qu'elle ne permet pas le contrôle du nombre de cellules positives et de leur intensité de transduction. De plus, elle peut induire la dissémination du transgène dans tout l'organisme, provoquant un risque de réponse immunitaire et/ou inflammatoire.

L'approche *in vivo* est particulièrement efficace pour le traitement des maladies hépatiques. En effet, le foie est facilement accessible par chirurgie, contrairement à d'autres organes tels que le cerveau. De plus, la vascularisation portale, qui représente la voie d'entrée principale du foie, permet à toute particule virale injectée dans la circulation sanguine systémique d'atteindre les hépatocytes. Ceci est également facilité par les fenestrations de l'endothélium hépatique.

Cette stratégie est très souvent utilisée en thérapie génique, car c'est la technique la moins contraignante. Par exemple, la correction à long terme de l'hémophilie B a été obtenue chez le chien et le primate non-humain, grâce à l'injection intra-systémique de virus adéno-associés recombinants (AAVr) portant l'ADNc du facteur IX de coagulation (Mount *et al.*, 2002 ; Nathwani *et al.*, 2002 ; Nathwani *et al.*, 2009).

Les deux approches de thérapie génique, *ex vivo* et *in vivo*, vont permettre le transfert d'un gène thérapeutique dans l'organisme. Dans ce but, l'utilisation d'ADN nu ou plasmidique s'est avérée peu efficace. Il a donc fallu développer des systèmes de transport, qui peuvent être soit synthétiques, soit dérivés de virus. Les différents points essentiels pour la caractérisation d'un vecteur sont la population cellulaire ciblée, l'efficacité du

transfert, et la cinétique d'expression du transgène. Un bon vecteur doit être capable de transduire un pourcentage maximal de cellules, avec une toxicité limitée et une expression stable dans le temps. De nombreux vecteurs, synthétiques ou dérivés de virus, sont disponibles actuellement.

2. Les vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques présentent de nombreux avantages. Ils permettent le transport d'ADN de grande taille, leur production est peu coûteuse comparée aux vecteurs viraux, et ils sont faiblement immunogènes. Un vecteur synthétique doit posséder différentes caractéristiques essentielles pour être efficace dans le foie (Ferry 1999) :

- Il doit être capable de compacter l'ADN et de masquer ses charges électrostatiques.
- Il doit empêcher la dégradation de l'ADN lors de la phase extracellulaire de transfert.
- Il doit permettre le ciblage vers les hépatocytes.

Les vecteurs synthétiques proviennent de l'association entre une molécule d'ADN anionique et un composé cationique. Les vecteurs synthétiques les plus prometteurs actuellement sont les lipoplexes et les polyplexes.

Les lipoplexes résultent d'interactions électrostatiques entre une molécule d'ADN canionique et des liposomes issus de l'association entre lipides cationiques (Wasungu et Hoekstra, 2006). Ces lipoplexes peuvent être galactosylés grâce à l'incorporation de glycoprotéines, de glycolipides synthétiques, ou de dérivés galactosylés du cholestérol (Kawakami, 2000). Ainsi, ils pourront cibler préférentiellement les hépatocytes, qui expriment des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASAGP-R) à leur surface sinusoidale (Pathak *et al.*, 2008). Un inconvénient des lipoplexes est qu'ils sont chargés positivement sur leur face externe, et peuvent donc interagir avec les macromolécules sériques chargées négativement. Cela a pour conséquence une limitation de l'efficacité de transfert de gène, en empêchant notamment le lipoplexe d'atteindre la cellule. Pour pallier ce problème, les liposomes peuvent être recouverts d'albumine. Cette stratégie de complexe ternaire améliore l'entrée du complexe dans la cellule, et permet aussi une meilleure libération

intracellulaire du transgène (Simões *et al.*, 2000). Enfin, il est également possible d'ajouter des séquences peptidiques ou des anticorps afin d'acquérir un tropisme cellulaire spécifique. Ces composés sont alors appelés lipopolyplexes.

Les polyplexes sont formés par l'association entre une molécule d'ADN anionique et un polymère cationique grâce à des liaisons électrostatiques. Les polyplexes de première génération résultent de l'assemblage entre une molécule d'ADN et de la poly-L-lysine (PLL). Ces complexes ne transduisent pas spontanément les cellules, et doivent être couplés à différents ligands afin de reconnaître des sites spécifiques sur les membranes des cellules hôtes. Ils sont ensuite internalisés par endocytose (Erbacher *et al.*, 1996). L'inconvénient des polyplexes est leur risque de dégradation par les lysosomes cellulaires. Pour éviter cela, la PLL peut être remplacée par du polyéthylèneimine (PEI) ou des dendrimères de polyamidoamines (PAA).

Une étude fut réalisée afin de comparer l'efficacité *in vivo* des lipoplexes et des vecteurs adénoviraux. Des souris âgées de 5-6 semaines furent injectées dans la veine caudale avec des adénovirus recombinants ($1-5 \times 10^{10}$ particules virales (pv) / souris) ou des lipoplexes (5-25 µg d'ADN plasmidique) portant l'ADNc de la luciférase. A 6 heures post injection, une expression très importante de luciférase fut observée dans le cœur, les poumons, la rate, les reins et le foie des souris ayant reçu les adénovirus, contrairement à celles qui avaient été injectées avec les lipoplexes. Dans ce cas, l'expression était uniquement détectable dans le cœur et les poumons. De plus, une augmentation importante de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-12 et TNF- α) fut observée avec les deux types de vecteurs. De manière surprenante, alors que les vecteurs synthétiques sont réputés pour être moins immunogènes que les vecteurs viraux, cette élévation des cytokines était nettement supérieure avec les lipoplexes. Ceci pourrait toutefois être lié à la grande fréquence de dinucléotides CpG non méthylés dans la structure des vecteurs synthétiques utilisés. Ceci fut confirmé par la construction de nouveaux lipoplexes sans aucune séquence CpG, qui suffit à prévenir cette élévation de cytokines (Sakurai *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, ces îlots CpG sont utilisés en tant qu'adjuvants dans des protocoles de vaccination, et pourraient également jouer un rôle dans le développement d'approches anticancéreuses (Klinman *et al.*, 2009).

Malgré de nombreux avantages, l'utilisation des lipoplexes ou des polyplexes est limitée par leur faible taux de transduction *in vivo*. A l'heure actuelle, seules quelques études ont été réalisées avec ce type de vecteurs, le plus souvent pour le traitement de pathologies pulmonaires. La majorité des essais de thérapie génique se concentre pour l'instant sur l'utilisation de vecteurs dérivés de virus.

3. Les vecteurs viraux

Les virus possèdent des propriétés structurales et fonctionnelles très intéressantes pour la thérapie génique. En effet, ils ont la capacité d'infecter et de faire exprimer leur matériel génétique de manière très efficace et dans une grande variété de types cellulaires. Les vecteurs dérivés de virus possèdent ces caractéristiques virales, mais sont délétés des séquences responsables de la réplication et de la pathogénicité du virus initial. Les quatre principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont les adénovirus, les rétrovirus (onco-rétrovirus et lentivirus), et les virus adéno-associés (AAV) recombinants. Chacun possède des caractéristiques spécifiques (Tableau 1) qui décideront du type de vecteur à utiliser selon le protocole thérapeutique envisagé.

Tableau 1. Principales caractéristiques des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

	Adénovirus	Onco-rétrovirus	Lentivirus	Virus adéno-associé (AAV)
Génome	ADNdb non enveloppé	ARNsb linéaire enveloppé	ARNsb linéaire enveloppé	ADNsb non enveloppé
Taille maximale de l'insert	36 kb	8 kb	8 kb	4.8 kb
Cellules cibles	En division ou quiescentes	En division seulement	En division ou quiescentes (phase G1b)	En division ou quiescentes
Expression du transgène	Transitoire	Stable	Stable	Stable
Intégration	Non	Oui	Oui	Possible
Immunité pré-existante chez l'hôte	Oui	Non	Non	Oui

sb : simple brin ; db : double brin

3.1. Adénovirus

Les adénovirus sont des virus non enveloppés d'environ 80 nm de diamètre. Il en existe 51 sérotypes chez l'Homme, dont la plupart sont impliqués dans des infections respiratoires bénignes. Le génome d'un adénovirus est constitué d'une molécule d'ADN linéaire double brin de 36 kb, flanquée de deux séquences terminales répétées inversées (ITR). Cet ADN possède quatre unités de transcription précoces, codant des protéines régulatrices (E1, E2, E3, E4), et une unité tardive de transduction, codant des protéines de structure. Les adénovirus persistent sous la forme d'épisome dans le génome de la cellule cible, ce qui limite le risque d'intégration. Les vecteurs dérivés des adénovirus de sérotype 2 ou 5 du groupe C sont les plus utilisés en thérapie génique (Figure 5).

Les vecteurs adénoviraux de première génération étaient délétés de la séquence E1, et parfois d'E3. Ils présentaient de nombreux avantages comme leur capacité à transduire des cellules quiescentes ou en division et leur tropisme naturel pour le foie, mais déclenchaient le plus souvent une forte réponse immunitaire et inflammatoire contre les protéines de la capsid virale, conduisant à l'élimination du transgène à court terme (Schnell *et al.*, 2001).

De nouveaux types d'adénovirus recombinants, dits de seconde génération, ont ensuite été développés. Malgré la délétion des séquences E1, E2, E3 et E4, ils continuaient à exprimer des protéines de la capsid virale, et induisaient donc de fortes réponses immunes. Les vecteurs adénoviraux de première et de seconde génération ne sont donc plus utilisés actuellement en thérapie génique pour le transfert de gènes thérapeutiques.

Une troisième génération de vecteurs recombinants adénoviraux a donc été développée pour la thérapie génique. Ce sont les adénovirus « helper-dépendants », ou « gutless ». Ils ne possèdent plus aucun gène viral, leur structure se limitant au transgène encadré des deux ITR. Toutes les séquences virales nécessaires à l'encapsidation et à l'expression du transgène sont apportées en *trans* par un plasmide « helper » (Figure 5). Les adénovirus « gutless » n'expriment donc pas de protéine de capsid, et n'induisent pas de réponse immune. Ils ont permis une expression stable et à long terme du transgène dans

des modèles animaux de maladies ciblant le foie, telles que le déficit en ornithine transcarbamylase, les hémophilies de type A et B, et la maladie de Crigler-Najjar de type 1.

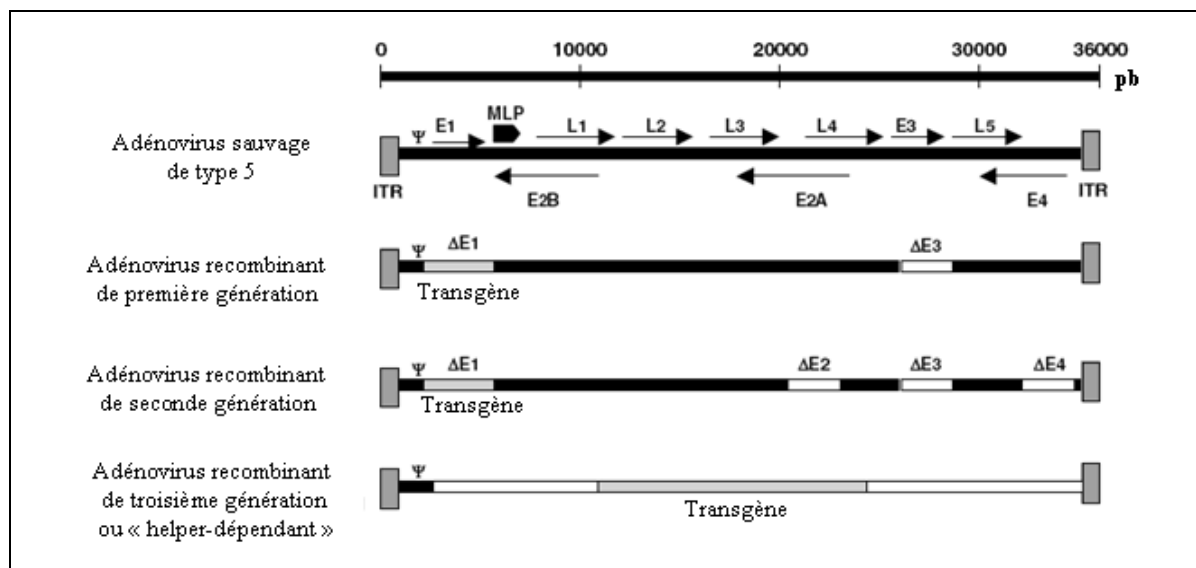


Figure 5. *Génome de l'adénovirus sauvage de type 5 et des différentes générations d'adénovirus recombinants utilisables en thérapie génique (d'après Alba et al., 2005).* Le génome de l'adénovirus sauvage de type 5 est constitué d'une molécule d'ADN double brin de 36 kb, encadrée de deux séquences ITR. Cet ADN permet la synthèse de transcrits précoces (E1 à E4) ou tardifs (L1 à L5). Les première et seconde générations de vecteurs viraux dérivés de l'adénovirus sauvage sont délétés des gènes nécessaires à la production des transcrits précoces. Les vecteurs adénoviraux de dernière génération sont dits « helper-dépendants ». Ils ne contiennent plus aucun gène du virus adénoviral d'origine, seuls le signal d'encapsidation et les deux ITR sont conservés.
E1-E4 : transcrits précoces ; ITR : séquences répétées inversées ; L1-L5 : transcrits tardifs ; MLP : promoteur tardif ; Ψ : signal d'encapsidation

Des adénovirus codant le facteur VIII sous contrôle du promoteur albumine ont été injectés en veine systémique à des souris de 4 à 8 semaines. Les doses étaient comprises entre 6×10^{10} et 3×10^{11} pv/souris, équivalentes à 3×10^{12} et 1.5×10^{13} pv/kg, respectivement. Deux types de vecteurs ont été comparés : des adénovirus recombinants délétés d'E1/E2a/E3, et des « gutless ». Malgré des résultats similaires en qPCR, les taux de transduction furent 10 fois supérieurs avec les vecteurs « gutless », et restèrent élevés pendant au moins de 9 mois. A l'inverse, les taux de facteur VIII diminuèrent rapidement avec les vecteurs adénoviraux d'ancienne génération, jusqu'à atteindre le seuil de détection. On observa cependant une diminution de l'expression d'environ 10 fois entre 2 et 40 semaines, avec les vecteurs « gutless ». La réinjection de 1.5×10^{13} pv/kg n'eut aucun

effet, peut être due à la présence d'anticorps anti-facteur VIII dans le sérum (Reddy *et al.*, 2002).

L'utilisation de vecteurs adénoviraux « helper-dépendants » permet la correction de l'hémophilie B à long terme dans le modèle canin. Dans cette étude, un chien fut injecté à 8.57×10^{11} (G11) et l'autre à 6.0×10^{11} pv/kg (G21). Les concentrations de facteur IX canin détectées dans le sérum étaient à des doses thérapeutiques chez les deux animaux, et 4 fois plus élevées chez le chien G11. Des anticorps neutralisants ont été détectés chez les deux chiens, et induisirent une diminution rapide des taux de facteur IX jusqu'à des valeurs indétectables, à 5 mois pour G11, et à 1.5 mois pour G21 (Ehrhardt *et al.*, 2003).

Des adénovirus recombinants furent également testés pour le traitement du déficit en α -1-antitrypsine (AAT) chez le primate non-humain. Une première injection adénovirus de sérotype 5 de première génération, à 6.2×10^{11} ou 1.4×10^{12} pv/kg, permit une expression efficace mais transitoire d'AAT humaine, due au déclenchement d'une réponse immunitaire. La réinjection de vecteurs de même sérotype, à la dose de 2.8×10^{11} pv/kg, n'induisit pas de ré-expression de la protéine. Une troisième injection de 6 à 7.2×10^{11} pv/kg de vecteurs adénoviraux de première génération et de sérotype 2, permit une augmentation des taux d'AAT similaire à celle obtenue lors de la première injection, mais transitoire également, à cause du développement d'anticorps neutralisants. A l'inverse, l'injection unique d'adénovirus recombinants « gutless » à environ 4×10^{11} pv/kg, aboutit à des taux élevés d'AAT à long terme. Ces concentrations protéiques diminuèrent progressivement, mais tout en restant dans des valeurs thérapeutiques pendant plus d'un an (Morral *et al.*, 1999).

L'utilisation de vecteurs adénoviraux de première et seconde génération ne permettaient donc qu'une expression transitoire du transgène, due au déclenchement d'une réponse immunitaire contre la capsid virale. Le développement de vecteurs « gutless », a permis de surmonter ce problème, aboutissant à la correction de pathologies à long terme dans de nombreux modèles animaux, grâce à l'absence d'expression de toute protéine virale. Toutefois, malgré leur développement il y a maintenant plus de 10 ans (Kochanek *et al.*, 1996), ces vecteurs ne sont toujours pas utilisés en clinique. Leur production implique une co-infection des cellules avec un adénovirus de première génération apportant les séquences virales nécessaires. Les lots produits actuellement sont souvent contaminés par

ces adénovirus auxiliaires. De plus, il existe des problèmes de production à large échelle, ce qui empêche aussi le développement de projets cliniques utilisant des adénovirus « gutless » recombinants (Dormond *et al.*, 2009).

3.2. Rétrovirus

3.2.1. Onco-rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus à ARN spécifiques des cellules eucaryotes. Il en existe de deux types : les onco-rétrovirus et les lentivirus. Les onco-rétrovirus sont des virus à ARN enveloppés. La capsidie contient le génome viral, une molécule d'ARN de transfert (ARNt), et les protéines nécessaires au cycle viral (protéase, transcriptase inverse, intégrase). Le génome des onco-rétrovirus est constitué de deux molécules d'ARN simple brin, chacune portant les séquences codantes de trois gènes (*gag*, *pol* et *env*), et étant encadrée de deux séquences terminales longues répétées (LTR). Le gène *gag* code les protéines de la capsidie, *env* code les protéines d'enveloppe. Le gène *pol* code une protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. La molécule d'ARNt sert d'amorce à la reverse transcriptase, qui va rétro-transcrire le génome viral. L'ADN double brin ainsi synthétisé va ensuite s'intégrer dans le génome de la cellule cible (Figure 6).

Les onco-rétrovirus ont été les premiers vecteurs viraux développés pour la thérapie génique (Mulligan, 1993). La plupart des protocoles actuellement en cours utilisent une stratégie *ex vivo*, afin d'induire en culture la prolifération cellulaire nécessaire à l'infection virale.

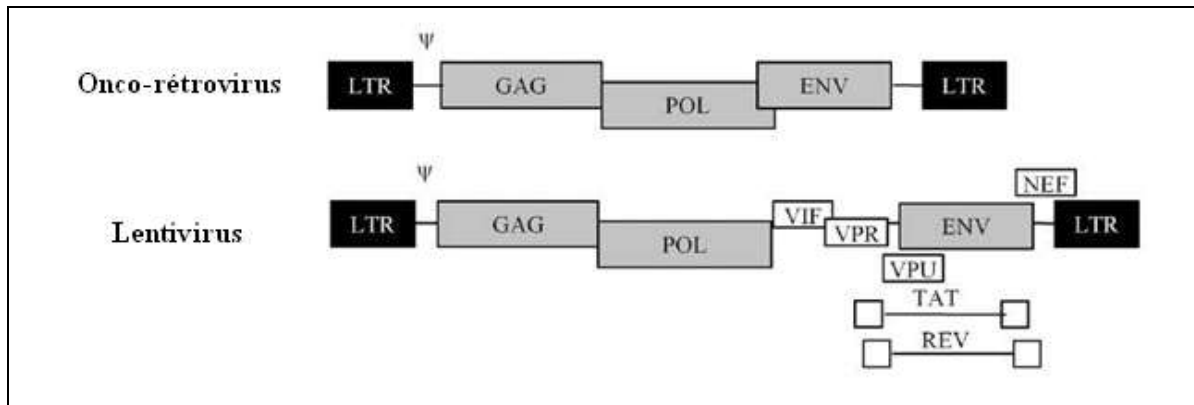


Figure 6. Génomes d'un onco-rétrovirus et d'un lentivirus (Hakkarainen et al., 2005). Les onco-rétrovirus et les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus. Leur génome est constitué de deux molécules d'ARN simple brin, chacune entourée de deux séquences LTR. Sur cette figure, une seule molécule d'ARN est représentée pour chaque type de rétrovirus. L'ARN des deux types de rétrovirus contient les séquences codantes de trois gènes (GAG, POL et ENV). Celui du lentivirus possède en plus les séquences de six gènes additionnels (VIF, VPR, VPU, NEF, TAT et REV).
LTR : séquences terminales longues répétées ; Ψ : signal d'encapsidation

En 1999, l'équipe du Pr. Fischer utilisa des vecteurs onco-rétroviraux dans un protocole visant à corriger le syndrome du déficit immunitaire combiné sévère lié à X (X-SCID) Cette pathologie, extrêmement grave, est due à des mutations dans le gène qui code la chaîne γ du récepteur aux interleukines 2, 4, 7, 9 et 15, ayant pour conséquence le blocage de la différenciation des lymphocytes T et des NK. Les lymphocytes B sont en concentration normale ou augmentée, mais ils sont peu fonctionnels. Il n'y a actuellement aucun traitement pour cette pathologie, excepté la greffe de moelle osseuse allogénique. Le protocole de thérapie génique développé par l'équipe du Pr. Fischer consistait à ponctionner de la moelle osseuse chez les patients, à trier les précurseurs hématopoïétiques CD34+, puis à les transduire avec des vecteurs onco-rétroviraux portant l'ADNc de la chaîne γ du récepteur déficient dans cette pathologie (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Cet essai permit la guérison de 9 patients sur 10. Malheureusement, quelques années plus tard 4 patients sur 9 développèrent une leucémie, due à l'insertion des vecteurs recombinants au niveau de proto-oncogènes. Chez trois de ces patients (P4, P5 et P10), cette insertion était située dans la structure du gène LMO-2 (LIM domain only-2). Un de ces trois patients (P10) présentait également une seconde insertion, au niveau du proto-oncogène BMI1 (B cell-specific Moloney-MLV Integration site 1). Enfin, un dernier patient (P7) montrait une insertion unique au niveau du proto-oncogène CCND2 (Cycline D2). Une chimiothérapie

permet de guérir 3 de ces 4 patients. Malheureusement, le patient P4 ne répondit pas au traitement, ni à deux transplantations de moelle osseuse. Il mourut 26 mois après le déclenchement de sa leucémie (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003 ; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2008). Malgré ce drame, le bilan des essais de thérapie génique pour le traitement du X-SCID est plutôt positif. Sur les 9 patients injectés, 8 sont guéris à long terme. Tous étaient des enfants ne pouvant bénéficier d'allogreffe, ainsi seule la thérapie génique pouvait permettre leur guérison.

3.2.2. Lentivirus

Les lentivirus possèdent un génome plus complexe que les oncorétrovirus, notamment les gènes qui codent six protéines additionnelles (tat, rev, vpr, vpu, nef et vif) jouant un rôle dans la maturation et l'exportation des ARNm viraux (Figure 6). La plupart de ces virus sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), et ont la capacité d'infecter les cellules en division ou non, comme les neurones ou les hépatocytes chez l'adulte.

La majorité des essais de thérapie génique en cours sont basés sur une approche *ex vivo*, afin de limiter les risques dus à la dissémination du vecteur. Le premier essai clinique utilisant des lentivirus recombinants consistait à faire exprimer un ARN anti-sens dirigé contre la protéine d'enveloppe du VIH dans des cellules CD4⁺ en culture. Après réinjection, le nombre de cellules T des patients resta relativement stable, tout comme leur charge virale (Levine *et al.*, 2006 ; Dropulic *et al.*, 2006). Cependant, il n'a pas été clairement établi si ces effets bénéfiques étaient imputables uniquement aux vecteurs, ou plutôt à la co-médication.

Les lentivirus sont également à l'étude pour le traitement de pathologies touchant le système nerveux, telles que les leucodystrophies ou la maladie de Parkinson. Un essai clinique est en cours pour la maladie de Parkinson, basé sur l'utilisation de vecteurs portant les trois gènes nécessaires à la synthèse de la dopamine. Ces « LentiVector® », injectés directement dans le striatum des malades, ont permis l'amélioration des fonctions motrices à 1 an post traitement (<http://www.oxfordbiomedica.co.uk>).

Enfin, la transduction *ex vivo* de cellules souches hématopoïétiques par des vecteurs lentiviraux a été testée pour le traitement d'hémoglobinopathies telles que la drépanocytose, la β -thalassémie, ou le syndrome de Wiskott-Aldrich (Schambach et Baum, 2008). Récemment, une alerte de l'agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (AFSSAPS ; mai 2009) a fait part d'une « dominance clonale relative » chez un patient traité contre la β -thalassémie, et guéri depuis 11 mois. Ce phénomène serait dû à l'intégration des vecteurs dans le gène codant HMGA2 (high mobility group AT-hook 2), une protéine pouvant être associée à des tumeurs bénignes ou malignes. Ce clone est stable depuis 5 mois, mais est toutefois en cours de surveillance (<http://www.afssaps.fr>).

Le principal problème des vecteurs rétroviraux vient donc du risque de mutagenèse insertionnelle, qui semble dû à la fois à la structure virale et au type de cellule ciblée. Dans le protocole mené par le Pr. Fischer, les vecteurs utilisés possédaient deux LTRs actives, qui pourraient être responsables d'une augmentation de la transcription du gène LMO-2. De plus les lymphocytes T sont des cellules assez particulières, susceptibles de proliférer après une stimulation exogène (Pagès et Bru, 2004 ; Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). Cet essai est le seul ayant réellement montré un risque de mutagenèse insertionnelle, c'est pourquoi les vecteurs rétroviraux sont encore utilisés dans de nombreux protocoles de thérapie génique. Toutefois, ce risque existe, et doit être examiné avec attention dans chaque étude.

3.3. Virus adéno-associés

Les virus adéno-associés, ou AAV, sont des virus de la famille des Parvovirus. Le principal avantage de ce type de virus est qu'ils sont issus de virus non pathogènes chez l'Homme, et permettent la transduction de cellules quiescentes ou en division. L'inconvénient des vecteurs dérivés des AAV (ou AAVr) est leur faible capacité d'encapsidation, limitée à environ 4.7kb. Les applications thérapeutiques de ces vecteurs seront détaillées dans le troisième chapitre de cette introduction.

III. Maladies héréditaires du foie candidates à la thérapie génique

La diversité des vecteurs viraux disponibles actuellement a permis la mise en place de nombreux protocoles de thérapie génique visant à soigner diverses maladies métaboliques héréditaires. Ces pathologies peuvent être classifiées en deux catégories : celles qui induisent des lésions histologiques du foie, et celles qui se caractérisent par des désordres uniquement extra hépatiques. A l'heure actuelle, le seul traitement totalement curatif de ces maladies reste la transplantation hépatique. Malheureusement, le manque de greffons a rendu indispensable le développement de nouvelles approches thérapeutiques. La thérapie génique semble donc être particulièrement intéressante pour ce type de pathologie. Nous allons tout d'abord détailler certaines de ces maladies candidates, puis les voies d'approches ainsi que les vecteurs utilisables dans des protocoles de thérapie génique ciblant le foie.

1. Maladies avec conséquences hépatiques

Les principales maladies héréditaires métaboliques induisant des lésions hépatiques, et potentiellement candidates à la thérapie génique, sont représentées dans le tableau 2. Ce sont toutes des maladies autosomiques récessives rares.

Dans le cas de certaines maladies héréditaires métaboliques induisant des lésions au niveau du foie, l'accumulation de substances toxiques dans les hépatocytes peut conduire à une grave hépatotoxicité. Il a été démontré que les hépatocytes sains ou corrigés par thérapie génique ou cellulaire pouvaient acquérir un avantage sélectif. Ainsi, la transduction d'un faible nombre d'hépatocytes va permettre la guérison progressive de tout l'organe (Mallet *et al.*, 2002).

Tableau 2. Principales maladies hépatiques héréditaires candidates pour la thérapie génique ayant des conséquences sur le foie (d'après les sites internet <http://www.orpha.net> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

Maladie (identifiant MIM)	Locus	Protéine déficiente	Modèle animal
Tyrosinémie de type 1 (276700)	15q23-q25	FAH	Souris Fah -/-
PFIC de types 2 et 3 (601847, 602347)	2q24 (PFIC 2) 7q21.1 (PFIC 3)	Transporteur ABC (PFIC 2) Glycoprotéine-P MDR3 (PFIC 3)	Souris mdr2 -/-
Déficit en AAT (107400)	14q32.1	α -1-antitrypsine	Souris transgénique Pi-Z
Maladie de Wilson (277900)	13q14.3-q21.1	ATPase -7B	Souris tx et rat LEC

AAT : α -1-antitrypsine ; ABC : ATP-binding cassette ; FAH : fumarylacétoacétate hydrolase ; LEC : Long - Evans Cinnamon ; MDR : multidrug resistance ; PFIC : Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis ; Souris Pi-Z : porteuse de l'allèle mutant Pi-Z de l' α -1-antitrypsine humaine ; tx : mutation « toxic milk »

1.1. Tyrosinémie héréditaire de type 1

La notion d'avantage sélectif a été démontrée grâce à des essais de thérapie cellulaire et génique dans le modèle murin de la tyrosinémie héréditaire de type 1. Cette pathologie est due à des mutations dans le gène codant la fumaryl acétoacétate hydrolase (FAH), une enzyme importante dans le catabolisme de la tyrosine. Le déficit en FAH entraîne une insuffisance hépatocellulaire sévère, et peut aussi provoquer des lésions rénales graves. Le traitement actuel de cette maladie est le NTBC [2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexedione], une drogue qui inhibe le catabolisme de la tyrosine, et empêche l'accumulation de métabolites toxiques (Masurel-Paulet *et al.*, 2008).

Le modèle murin de la tyrosinémie héréditaire de type 1 est la souris Fah -/-, présentant une forte mortalité périnatale en absence de traitement au NTBC. Dans un essai

de thérapie génique réalisé dans l'équipe du Dr. Grompe, 1×10^6 hépatocytes provenant de souris mâles sauvages congéniques furent injectés dans la rate de souris femelles Fah^{-/-}. Le traitement classique au NTBC fut ensuite stoppé chez une partie des souris injectées, et continué chez les autres. Les auteurs observèrent un gain de poids dans les deux groupes, contrairement aux animaux non traités qui moururent en l'espace de deux mois. Au sacrifice à 8 mois post transplantation, le foie des souris injectées était d'aspect normal, mais des variations furent observées dans les mesures d'activité FAH. Dans le groupe où le traitement NTBC avait été stoppé, l'activité était comprise entre 70 et 110% de celle des témoins sains, et plus de 80% des hépatocytes étaient marqués en immunohistochimie. Chez les souris ayant continué à recevoir le NTBC, l'activité enzymatique était inférieure à 5%. Leurs auteurs conclurent que le traitement au NTBC pouvait induire un blocage de la sélection. Néanmoins, cette expérimentation apporta la preuve de principe d'un repeuplement sélectif dans le foie par thérapie cellulaire (Overturf *et al.*, 1996).

Dans le même article, les auteurs réalisèrent ensuite des transplantations d'hépatocytes en quantités décroissantes, soit en veine porte (pour 10^3 hépatocytes ou moins), soit dans la rate (pour 10^4 hépatocytes ou plus) d'autres souris Fah^{-/-}. L'injection de 10^4 ou 10^5 hépatocytes induisit la survie de tous les animaux transplantés. L'administration de 10^3 cellules permit la guérison de 5 souris sur 6. La transplantation de quantités inférieures d'hépatocytes aboutit à des taux de mortalité élevés. Chez les souris guéries, les auteurs observèrent un mosaïcisme du foie, avec des zones d'hépatocyte sains exprimant la FAH, et du tissu adjacent atteint de dysplasie, de nécrose et d'inflammation. Il semblerait donc que 10^3 hépatocytes soit le seuil minimum permettant un repeuplement d'au moins 50% du foie (Overturf *et al.*, 1996).

Dans une troisième expérience, des injections de vecteurs rétroviraux exprimant la FAH sous contrôle des LTR virales furent testées. Une seule injection intra-portale de rétrovirus, soit 2 jours après hépatectomie partielle, soit 7 jours après arrêt du traitement NTBC, n'induisit qu'une activité enzymatique d'environ 13%. Afin d'augmenter l'efficacité de ces vecteurs, des injections supplémentaires furent réalisées à 2, 3, 4, 10 et 11 jours, grâce à la pose d'un cathéter dans la veine porte. Entre 8 et 12 semaines post injection, l'activité enzymatique moyenne atteignait les 59%. On observait plus de 80% de cellules positives en immunohistochimie, contre 1% seulement à 48h post injection. Cela signifie donc que le nombre de cellules positives et l'activité FAH au sacrifice ne sont pas dues à un fort taux de transduction initial, mais sont bien le fait d'un repeuplement du foie par les cellules exprimant le transgène.

Enfin, les auteurs utilisèrent des vecteurs adénoviraux porteurs de l'ADNc la FAH. Entre 6 et 9 mois post injection, le taux de transduction était supérieur à 20%. Cependant, 9 des 13 souris avaient développé un carcinome hépatocellulaire, qui pourrait être dû à un repeuplement insuffisant du foie (Overturf *et al.*, 1997 et 1998).

1.2. Cholestases intrahépatiques familiales progressives

Les cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC) de type 2 ou 3 sont induites par des mutations dans les gènes codant le transporteur ABC (PFIC 2) ou la glycoprotéine-P MDR3 (PFIC 3). Cela provoque un défaut de sécrétion des phospholipides biliaires, ou cholestase, qui progresse en fibrose hépatique ou cirrhose. A l'heure actuelle, la transplantation hépatique reste le seul traitement curatif possible.

Dans cette maladie, un repeuplement sélectif du foie par des hépatocytes transduits semble possible. Tout d'abord, l'accumulation intrahépatique de sels biliaires induit une régénération continue du foie. De plus, les hépatocytes exprimant l'enzyme déficiente vont produire des lipides afin de se protéger contre ces amas biliaires, leur conférant un avantage prolifératif. Ainsi, des études réalisées chez la souris *mdr2* ^{-/-}, modèle animal de la PFIC de type 3, ont montré que la transplantation d'hépatocytes exprimant la MDR3 humaine ou la *mdr2* murine permettait une correction partielle de la pathologie (De Vree *et al.*, 2000). Dans cette étude, 2×10^6 hépatocytes provenant de souris transgéniques et exprimant les protéines *mdr2* et MDR3 ont été transplantés dans la rate de souris *mdr2* ^{-/-}. Ces souris ont ensuite reçu un régime normal ou enrichi en cholates, qui augmente la cytotoxicité des sels biliaires. Dans un premier temps, le régime enrichi en cholates permit une repopulation hépatocytaire importante, mais par la suite le niveau de sécrétion diminua de façon importante, 4 à 12 mois post transplantation. A long terme, l'accumulation de sécrétions lipidiques au niveau des hépatocytes transduits inhibe la prolifération de ces cellules. Ce sont les zones non repeuplées qui prolifèrent. A long terme, les auteurs observèrent des tumeurs hépatiques chez 3 animaux sur 4, contre seulement 1 sur 6 chez les animaux ayant reçu le régime normal. Dans le cas des souris n'ayant pas reçu de cholates, l'activité atteint 12%, par rapport aux contrôles sains (+/+). La transplantation d'hépatocytes transgéniques codant la protéine MDR3 humaine permet une activité similaire, d'environ 9%. Ces résultats sont donc très encourageants, car chez la souris, une

expression de 15% de MDR3 induit la disparition de tout signe pathologique (Ferry et Heard, 1998).

1.3. Déficit en α -1-antitrypsine

Le déficit en α -1-antitrypsine est une pathologie rare due à des mutations dans le gène *SERPINA1* codant l' α -1-antitrypsine (AAT), principal inhibiteur de protéases (Pi) du sang. Les mutations les plus courantes sont Pi-Z et Pi-S, la combinaison la plus grave étant Pi-ZZ. L'AAT est une protéine produite dans les hépatocytes puis relarguée dans la circulation sanguine. Elle joue un rôle de protection du tissu pulmonaire contre des dégâts protéolytiques (Fregonese et Stolk, 2008).

Le déficit en AAT se caractérise par des taux faibles d'enzyme dans le sérum, conduisant à un emphysème pulmonaire et une cirrhose hépatique. Le traitement actuel de la maladie consiste en des injections intraveineuses d'AAT, afin de limiter les dégâts pulmonaires. Actuellement, seule une transplantation foie/poumon est curative. Elle est souvent réalisée chez l'enfant, mais très rarement chez l'adulte (Fairbanks *et al.*, 2008).

Des essais de thérapie génique ont été réalisés avec des rétrovirus, des adénovirus, des AAV ou des liposomes (Wood et Stockley, 2007). Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec les vecteurs AAV, qui ont permis la synthèse d'AAT à des doses thérapeutiques chez des souris injectées dans le muscle (Lu *et al.*, 2006) ou la veine porte (Song *et al.*, 2001).

Un essai clinique utilisant des AAV2 injectés par voie intra-musculaire n'induisit qu'une faible expression du transgène, avec 1 patient sur 12 seulement supérieur au bruit de fond (Brantly *et al.*, 2006). Une étude ultérieure fut réalisée avec des AAVr de sérotype 1, plus adaptés pour la transduction dans le muscle. Cet essai de phase 1 recruta 9 patients, injectés en intra-musculaire avec 6.9×10^{12} à 6×10^{13} pv. Certains de ces patients reçurent en plus un traitement par injection d'AAT à 28 ou 56h avant l'injection d'AAV. Malgré l'apparition rapide d'anticorps dirigés contre la capside chez tous les patients, l'expression du transgène fut maintenue pendant plus d'un an. Elle n'atteignit cependant que 0.1% du taux normal de protéine chez les patients ayant reçu la plus forte dose (Brantly *et al.*, 2009).

1.4. Maladie de Wilson

La maladie de Wilson est liée à des mutations dans le gène *ATP7B* qui code un transporteur du cuivre. Ceci provoque une accumulation toxique de cuivre dans l'organisme, ayant pour conséquence des troubles neuropsychiatriques et des atteintes du foie telles qu'une hépatite ou une cirrhose. Les traitements actuels visent à empêcher l'accumulation ou à détruire les dépôts de cuivre, mais ne traitent pas l'origine de la pathologie. La maladie de Wilson est une cible intéressante pour la thérapie génique ou cellulaire, car les nouvelles cellules exprimant le gène *ATP7B* vont permettre la diminution de la quantité présente de cuivre, et la protection du foie contre de nouveaux dépôts. Ces deux fonctions, bénéfiques pour l'organisme, leur confèrent un avantage sélectif important. Il existe deux modèles animaux de cette pathologie : la souris tx (toxic milk), et le rat Long-Evans Cinnamon. Les souris ont une durée de vie normale, tandis que les rats ont une mortalité de 50% à 6 mois.

Des études de thérapie cellulaire furent réalisées chez le modèle de la souris tx. La transplantation de 1×10^6 hépatocytes de souris saines âgées de 6-8 semaines, dans la rate de souris tx de 3-4 mois, induisit une diminution du niveau de cuivre dans le foie, les reins et la rate, à 4 mois post traitement. Toutefois, aucune baisse significative ne fut observée dans le cerveau (Allen *et al.*, 2004). Dans cette étude, le nombre de cellules transplantées représentaient moins de 3% de la masse du foie receveur. Ceci laisse donc supposer que la correction de la pathologie ne peut pas être attribuée uniquement à ces cellules. Il y a donc eu repeuplement du foie par avantage sélectif. En ce qui concerne l'absence d'améliorations au niveau cérébral, peut être est-ce dû à un sacrifice trop précoce des animaux. En effet, chez Homme il faut attendre au moins 1 an pour avoir des résultats bénéfiques après un traitement chimique ou une transplantation hépatique (Wu *et al.*, 2000 ; Lingam *et al.*, 1998).

L'une des différences entre les deux modèles animaux de la maladie de Wilson est qu'il n'y a pas besoin de stimulus prolifératif chez la souris tx, tandis que c'est nécessaire chez le rat Long-Evans Cinnamon. Une hépatectomie partielle est donc souvent nécessaire chez le rat adulte. Afin de contourner ce problème, les injections peuvent être réalisées chez des animaux très jeunes. Ainsi, la transplantation d'hépatocytes de rats sains, dans la

rate de rats malades âgés de 1 à 2 semaines, permit un repeuplement significatif du foie chez 10 animaux sur 14, dont 6 totalement guéris à 20 mois post injection. (Malhi *et al.*, 2002).

Des vecteurs adénoviraux délétés des séquences E1a, E1b et E3, furent injectés à des rats Long-Evans Cinnamon adultes. L'expression du transgène ne fut que transitoire, limitée par une forte réponse immune provoquant la disparition des cellules transduites en moins de deux semaines (Terada *et al.*, 1998). D'autres études utilisant des vecteurs lentiviraux, furent également réalisées. Ces stratégies étaient soit *ex vivo*, par l'administration intra-splénique d'hépatocytes transduits grâce à des lentivirus recombinants, soit *in vivo*, par l'injection directe de ces vecteurs chez l'animal, par la voie systémique. Le suivi des animaux à long terme montra une expression du transgène pendant toute la durée de l'expérimentation, soit 24 semaines. Elle était néanmoins inférieure à celle mesurée dès 2 semaines post injection, ce qui suggère l'existence d'une réponse immune, mais de faible importance. L'injection des vecteurs *in vivo* s'avéra être la plus efficace des deux stratégies (Merle *et al.*, 2006)

Les AAV ne sont pas utilisés pour le traitement de la maladie de Wilson, pour deux raisons principales. Tout d'abord, l'accumulation toxique de cuivre dans le foie entraîne une prolifération des hépatocytes, ce qui conduirait progressivement à la perte du vecteur. De plus, le gène *ATP7B* mesure 4.5 kb, ce qui ne permet pas son encapsidation dans ce type de vecteur. Toutefois, ce dernier inconvénient pourrait être surmonté par l'utilisation de la technique de trans-épissage (voir chapitre 3 sur l'utilisation des AAV en thérapie génique).

Cette liste de maladies candidates à la thérapie génique n'est pas exhaustive, et d'autres pathologies sont également candidates, telles que la fructosémie congénitale, les glycoséoses de type I, II, ou IV, l'hémochromatose héréditaire, la mucopolysaccharidose de type VII, ou le défaut congénital de synthèse des acides biliaires.

2. Maladies sans conséquences hépatiques

A l'inverse, il existe également des pathologies métaboliques sans lésions hépatiques, qui peuvent également être candidates à des essais de thérapie génique ciblant

le foie. Dans ce type de maladie, les hépatocytes transduits n'acquièrent pas d'avantage sélectif, et les taux de transduction minimaux permettant d'obtenir une correction phénotypique sont relativement variables selon la pathologie étudiée (Figure 7). Par exemple, le taux de transduction nécessaire à la synthèse d'une protéine dans un type cellulaire ou un organe particulier sera souvent plus élevé que pour un composé produit de manière ubiquiste. L'intensité de l'activité métabolique à réguler doit être également prise en compte. Ainsi, le nombre de cellules positives nécessaires sera plus faible dans la maladie de Crigler-Najjar que dans les pathologies liées aux lipoprotéines. En effet, dans le premier cas, les quantités de bilirubine à dégrader seront nettement inférieures aux concentrations plasmatiques de lipoprotéines à métaboliser dans le second type de pathologie (Brunetti-Pierri et Lee, 2005).

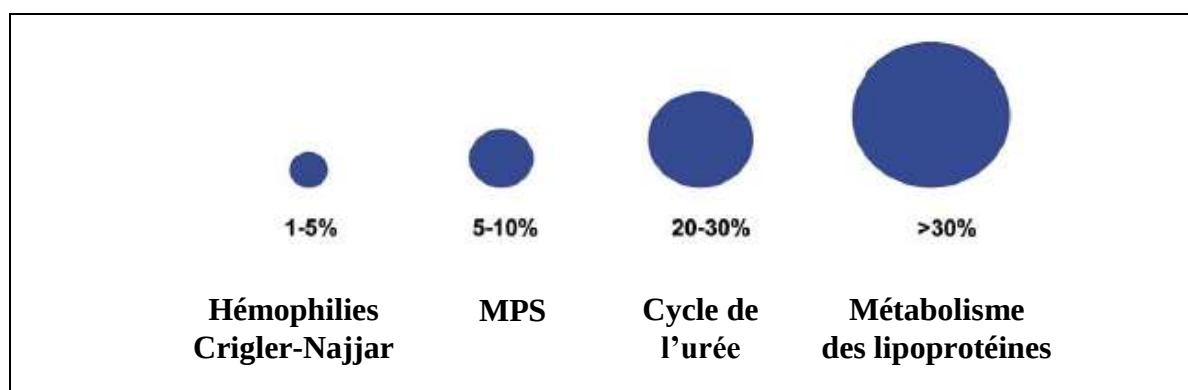


Figure 7. Pourcentages de transduction hépatocytaire nécessaires à la correction phénotypique de différentes maladies métaboliques (d'après Brunetti-Pierri et Lee, 2005)

Les niveaux de transduction permettant une correction des principales maladies métaboliques héréditaires varient en fonction de paramètres tels que le fait que l'enzyme impliquée soit spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire donné, ou les quantités de substrats à métaboliser. Par exemple, le pourcentage de transduction à atteindre sera plus élevé dans des pathologies affectant le métabolisme des lipoprotéines, que pour les hémophilies ou la maladie de Crigler-Najjar.

MPS : Mucopolysaccharidoses

Les principales maladies métaboliques héréditaires dues à un déficit en enzyme du foie, mais n'induisant pas de lésions hépatiques, sont détaillées dans le tableau 3. Le mode de transmission de ces maladies est variable. Dans le cas du déficit en ornithine trans carbamylase, il s'agit d'un mode récessif ou dominant lié à X. Les hémophilies A et B sont récessives liées à X. L'hypercholestérolémie familiale de type IIa est le plus souvent de forme dominante. Une transmission récessif est également possible, mais beaucoup plus

rare. Enfin, la maladie de Crigler-Najjar de type I se transmet selon un mode autosomique récessif.

Tableau 3. Principales maladies hépatiques héréditaires sans conséquences histologiques sur le foie, et candidates à la thérapie génique (d'après les sites internet <http://www.orpha.net> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

Maladie (identifiant MIM)	Locus	Protéine déficiente	Modèle animal
Déficit en OTC (311250)	Xp21.1	OTC	Souris spf-ash
Hypercholestérolémie familiale de type IIa (143890)	19p13.2, 1q21-q23, 9q22-q31, 8p21-p12, 7p15, 3p21.2-p14.1	Récepteur aux LDL	Lapin Watanabe et souris knock-out
Hémophilies de type A et B (306700, 306900)	Xq28 (type A) Xq27.1-q27.2 (type B)	Facteurs de coagulation VIII (type A) IX (type B)	Souris transgénique et chien hémophile
Crigler-Najjar de type I (218800)	2q37	UGT1A1	Rat Gunn

LDL : low density lipoproteins ; spf-ash : sparse fur with abnormal skin and hair ; OTC : ornithine trans carbamylase ; UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransferase de type 1

2.1. Déficit en ornithine transcarbamylase

Le déficit en ornithine transcarbamylase (OTC) est une maladie rare due une déficience en OTC, une enzyme mitochondriale hépatique jouant un rôle essentiel dans le cycle de l'urée. L'absence de cette enzyme provoque une accumulation d'ammoniaque très toxique pour le système nerveux central et pouvant induire de graves troubles neurologiques. Le seul traitement curatif actuel reste la transplantation hépatique.

L'utilisation de vecteurs adénoviraux de première génération, codant l'OTC humaine, permirent une correction transitoire de la pathologie chez la souris adulte (Ye et

al., 1996 ; Ye *et al.* 1997). Dans une de ces études, l'injection de 3.5×10^9 pfu (particule forming unit) /kg chez une souris induisit même le décès de l'animal en 24 h. Des analyses histologiques révélèrent des lésions nécrotiques et inflammatoires. L'injection de doses plus faibles (0.04 - 1 pfu/kg) à d'autres souris permit une correction importante pendant 2 mois, mais seulement transitoire. Cette efficacité de transduction était proportionnelle à la dose injectée. Une réinjection fut réalisée chez 3 souris, mais sans succès. Les auteurs détectèrent des taux élevés d'anticorps neutralisants chez ces 3 animaux, à 60 jours suivant la première injection. Ces taux étaient de 10 à 100 fois plus élevés après la seconde injection (Kiwaki *et al.*, 1996).

Des vecteurs adénoviraux plus récents, réputés pour être moins pathogènes car « helper-dépendants », furent ensuite testés. Une séquence WPRE (woodchuck post regulatory element) fut insérée dans ces vecteurs, afin d'augmenter la stabilité de l'ARNm, et d'améliorer l'expression protéique à long terme. Des souris âgées de 12-16 semaines reçurent 1×10^{13} pv/kg, par la veine caudale. L'efficacité des adénovirus sans séquence WPRE était significative à 1 semaine post injection, mais seulement transitoire, car à 2 semaines le niveau d'OTC était revenu à un niveau similaire au groupe non injecté. A l'inverse, l'ajout d'une séquence WPRE permit une correction totale et stable pendant les 25 semaines de l'expérimentation. Des analyses comparatives montrèrent que les taux de transduction étaient similaires avec ou sans WPRE, mais que les niveaux d'ARNm et de protéines étaient supérieurs avec cette séquence. Dans ce groupe, aucune mortalité ne fut détectée à 1 an post injection (Mian *et al* 2004).

Des vecteurs adénoviraux de seconde puis de troisième génération furent ensuite testés chez la souris et le primate non-humain (Raper *et al.*, 1998) , avant la mise en place d'un essai clinique de phase I. Dans cette étude, 18 patients (OTC.002 à OTC.019), répartis en 6 groupes, reçurent des vecteurs adénoviraux délétés des séquences E1 et E4 à des doses comprises entre 2×10^9 et 6×10^{11} pv/kg, par l'artère hépatique droite. Entre 24 et 48h post injections, des symptômes fiévreux furent observés chez tous les patients, surement dus à une légère toxicité des vecteurs. Une élévation des transaminases (AST) fut également détectée chez certains patients. Cependant, tous ces paramètres retournèrent progressivement à des valeurs normales. Des analyses réalisées sur des biopsies hépatiques ne révélèrent qu'une faible activité enzymatique, atteignant au maximum 1%. Les deux patients du sixième groupe reçurent la dose maximale de 6×10^{11} pv/kg. Cette dose était cependant 17 fois inférieure à la dose des vecteurs de première génération - et donc encore plus toxiques - ayant provoqué une réaction inflammatoire chez primate non-humain. Le

premier patient, OTC.018, était une femme de 19 ans, qui développa les mêmes symptômes que les 16 autres malades. Le second patient, Jesse Gelsinger (OTC.019), un homme de 18 ans, fut victime d'une inflammation systémique extrêmement grave, entraînant une jaunisse, un défaut de coagulation sévère, puis des affections dans de nombreux organes qui conduisirent à son décès, à seulement 98h post injection (Raper *et al.*, 2002 ; Raper *et al.*, 2003). Des questions subsistent encore afin de comprendre les facteurs qui ont conduit au déclenchement d'une réponse si grave chez ce patient. Les hypothèses avancées actuellement sont une prédisposition génétique, ou une mémoire immune due à une pré-exposition à des adénovirus (Wilson *et al.*, 2009). En effet, chez ce patient les taux d'anticorps neutralisants étaient très élevés (1/80, contre 1/20 chez la patiente OTC.017). Cet essai fut donc stoppé en septembre 1999, soit 2 ans après l'inclusion du premier patient.

2.2. Hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale de type IIa est induite par des mutations dans le gène codant le récepteur aux LDL (low density lipoproteins). Elle se caractérise par des taux importants de cholestérol dans le sérum, entraînant un risque élevé d'athérosclérose. Cette pathologie est létale à l'état homozygote (-/-), et aucun traitement curatif n'est disponible actuellement, excepté la transplantation hépatique, ce qui en fait une bonne candidate pour la thérapie génique.

La transplantation d'hépatocytes autologues modifiés *ex vivo* par vecteurs rétroviraux, chez le lapin Watanabe, a permis la guérison de ce modèle animal pendant les 6.5 mois de l'étude (Chowdhury *et al.*, 1991). D'autres études, réalisées chez le chien et le primate non-humain, eurent pour but le contrôle de la faisabilité et de l'efficacité du protocole (Grossman *et al.*, 1992 ; Grossman *et al.*, 1993). Ces expérimentations permirent la greffe stable des cellules injectées à long terme chez le primate non-humain, et conduisirent ensuite au développement du premier protocole clinique de thérapie génique ciblant le foie. (Wilson *et al.*, 1992). Le premier patient inclus dans cette étude (FH1) était une femme 18 ans, homozygote pour une mutation faux-sens dans le gène du récepteur aux LDL. Le protocole consistait à faire une résection de 15% de la masse hépatique, par l'ablation du segment latéral gauche. Ceci permit la récupération de 3.2×10^9 hépatocytes,

transduits ensuite *ex vivo* par des vecteurs rétroviraux codant le récepteur humain aux LDL. 2×10^9 cellules furent ensuite récupérées puis réinjectées à J3 chez la patiente, directement par la veine mésentérique inférieure. Le suivi à 18 mois post opération montra une expression à long terme du transgène, et aucun anticorps dirigé contre la protéine ne fut détecté (Grossman *et al.*, 1994). Deux des autres patients de cette étude (FH3 et FH5) montrèrent également une diminution significative des taux sériques de cholestérol total, de LDL et d'ApoB. Pour le quatrième patient (FH4), seule une faible baisse du niveau de LDL, mais significative, fut mesurée. Enfin, aucun effet thérapeutique ne fut observé chez un autre patient (FH2). Ceci pourrait être lié aux problèmes rencontrés lors de la culture des hépatocytes avant leur ré-injection au malade. Néanmoins, cela semble montrer qu'une résection partielle du foie n'induit aucun effet thérapeutique par elle-même, et que la diminution du taux de LDL dans le sérum chez les autres patients n'était imputable qu'à la thérapie génique (Grossman *et al.*, 1995). Cependant, ceci n'est pas une preuve formelle, et un éventuel rôle de la résection hépatique fut exposé par d'autres équipes de recherche (Brown *et al.*, 1994 ; Weatherall, 1994).

Des vecteurs AAV ont été testés récemment pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale chez la souris. Des souris C57Bl6 déficientes pour le récepteur aux LDL, ont subi un régime hyperlipidique pendant 3 semaines, puis ont été injectées avec des vecteurs AAV de sérotype 2, 2/7 ou 2/8 codant le récepteur aux LDL humain sous contrôle d'un promoteur foie-spécifique. Les vecteurs furent injectés à la dose de 1×10^{12} particules par souris, dans la veine porte. A 8 semaines post injection, le nombre de copies du transgène était 5 fois ou 25 fois plus élevé avec les AAV2/7 ou AAV2/8, en comparaison à l'AAV2. Les taux protéiques détectés étaient également supérieurs avec ces deux nouveaux types de vecteurs. Les AAV2/8 permirent une correction complète du métabolisme lipidique, dès 28 jours après l'injection, et pour toute la durée de l'étude. A l'inverse, les effets des AAV2 et 2/7 étaient très faibles. Des dosages à 20 semaines post injection confirmèrent la guérison complète des animaux avec les AAV2/8. De façon inattendue, les mêmes résultats furent observés avec le sérotype 2/7, contrairement aux résultats à court terme, qui étaient peu encourageants (Lebherz *et al.*, 2004).

2.3. Hémophilies

Les hémophilies sont des maladies dues à un déficit complet ou partiel en facteurs de coagulation de type VIII (type A) ou IX (type B). Il existe différents degrés de gravité, selon le taux plasmatique résiduel de facteur VIII ou IX. Les principaux symptômes sont le déclenchement d'hémorragies récurrentes dans les articulations (hémarthroses) et les muscles (hématomes), pouvant être fatales. Le traitement actuel des hémophilies consiste en des injections intraveineuses répétées de facteurs de coagulation recombinants. Cette pratique est efficace pour le traitement des patients mais comporte des risques tels que la formation d'inhibiteurs ou le déclenchement de réactions allergènes. Les hémophilies sont intéressantes pour la thérapie génique, car un faible taux de transduction des hépatocytes permettrait un bénéfice clinique important.

L'utilisation d'adénovirus recombinants de première génération ne permit qu'une correction transitoire de l'hémophilie chez les modèles murin, canin, et simien. Ces résultats furent imputables à la forte toxicité de ces vecteurs, conduisant à des réponses immunitaires et/ou inflammatoires sévères. Par exemple, l'injection de vecteurs adénoviraux portant l'ADNc du facteur IX humain chez la souris d'induisit qu'une expression transitoire du transgène. En outre, une seconde injection des mêmes vecteurs n'eut aucun effet bénéfique (Smith *et al.*, 1993). A l'inverse des adénovirus recombinants permirent une correction stable et à long terme de l'hémophilie A chez la souris SCID, ayant un déficit immunitaire sévère (Chuah *et al.*, 2003).

Le développement de nouvelles générations de vecteurs adénoviraux n'induisit pas non plus une correction à long terme de l'hémophilie dans des modèles animaux. Par exemple, l'équipe du Dr. Connelly injecta des adénovirus recombinants délétés des séquences E1/E2a/E3 chez des primates non-humains âgés d'environ 2 ans. Ces vecteurs, porteurs d'un fragment d'ADNc du facteur VIII humain sous contrôle d'un promoteur foie-spécifique, furent administrés à la dose de 3×10^{12} pv/kg, par la veine saphène. L'expression du facteur VIII dura moins d'un mois, malgré la détection du transgène jusqu'à la fin de l'étude, à J56. Des anticorps dirigés contre le facteur VIII furent détectés chez 2 animaux sur 4, et une élévation des transaminases hépatiques et de l'IL-6 chez les 4 animaux (Andrews *et al.*, 2002). L'utilisation du même type d'adénovirus - délétés de

E1/E2a/E3 - n'induisit également qu'une expression transitoire de facteurs VIII chez le chien à très court terme (Gallo-Penn *et al.*, 2001).

Des vecteurs adénoviraux « gutless » injectés chez le chien atteint d'hémophilie B conduisirent à des concentrations thérapeutiques de facteur IX pendant 2.5 mois. Ce taux de facteur IX diminua par la suite, mais une correction résiduelle persista pendant quelques mois, sans qu'une toxicité hépatique ne soit observée (Ehrhardt *et al.*, 2003). Chez la souris atteinte d'hémophilie A, des adénovirus recombinants « gutless » induisirent une expression à long terme de facteur VIII. Cependant, des problèmes de toxicité, liés la contamination des lots de vecteurs par l'adénovirus auxiliaire nécessaire lors de la phase de production, furent observés (Reddy *et al.*, 2002)

Le premier patient hémophile traité par des adénoviraux « gutless » eut des taux de facteurs VIII sériques équivalents à 1% de la valeur normale, pendant plusieurs mois. Malheureusement, une réponse inflammatoire et dégâts hépatiques furent observés (Chuah *et al.*, 2004). Les vecteurs adénoviraux, même débarrassés de toutes les séquences virales, ne sont pas adaptés au traitement à long terme de l'hémophilie, en raison de bénéfices thérapeutiques variables, et de leur risque élevé d'hépatotoxicité.

L'utilisation d'un autre type de vecteurs, les lentivirus, peut également induire une forte immunogénicité et empêcher l'expression du transgène à long terme. Afin de palier ce problème, des améliorations peuvent être apportées, telles que le ciblage des hépatocytes grâce à un promoteur foie-spécifique (Follenzi *et al.*, 2004). Une autre stratégie consiste à construire des vecteurs comportant la séquence cible du miR-142-3p. Cette structure va reconnaître spécifiquement le microARN 142-3p dans le génome des cellules du système immunitaire, activant ainsi le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Cela a pour conséquence la dégradation de l'ARNm, et donc l'absence d'expression du transgène dans les cellules du système immunitaire. Les cellules du foie, qui ne possèdent pas le microARN 142-3p, ne sont pas affectées par ce système. Ainsi, l'ARNm n'est pas dégradé, et peut être traduit normalement. Cette technique permet une expression thérapeutique du facteur IX humain pendant plus de 280 jours chez la souris, sans qu'aucun anticorps ne fut détecté (Brown *et al.*, 2007).

Une étude comparative fut également réalisée afin de tester l'efficacité des lentivirus recombinants vis-à-vis d'autres types de vecteurs, les AAVr. Dans cette

expérience, les vecteurs AAV contenaient l'ADNc du facteur IX humain sous contrôle soit du promoteur ubiquiste CAG, soit du promoteur Apo/AAT (apolipoprotein E/ α -1-antitrypsine). Ce dernier contenait une région hépato-spécifique (HCR) afin de permettre son expression uniquement dans le foie. Les deux types de promoteurs furent ensuite utilisés pour la construction d'AAVr de sérotype 8 ou 9, puis $1-3 \times 10^{11}$ pv furent injectées à des souris de 7 semaines. Les dosages d'activité enzymatique dans le sérum montrèrent une importante efficacité des vecteurs possédant le promoteur Apo/AAT, avec des taux de facteur IX pouvant atteindre 3000 à 6000% de la normale, très nettement supérieurs aux valeurs obtenues avec le promoteur CAG. L'injection de vecteurs lentiviraux portant le même ADNc, également sous contrôle du promoteur foie-spécifique Apo/AAT, ne permit qu'une expression partielle de facteur IX. Malgré une élévation transitoire d'IL-6, l'activité enzymatique du facteur IX resta stable mais faible, à environ 1% de la normale. Des résultats similaires furent obtenus avec le promoteur ubiquiste CAG (VandenDriessche *et al.*, 2007).

Les AAVr semblent donc être particulièrement efficaces pour le traitement de l'hémophilie chez la souris, et furent ensuite testés dans des modèles animaux plus gros. Chez le chien, l'injection d'AAVr codant le facteur IX canin sous contrôle du promoteur ApoE/AAT, à une dose de 1×10^{12} pv/kg, permet la guérison de 3 chiens sur 4. L'activité enzymatique, mesurée dans le sérum, resta comprise entre 5 et 12% pendant plus de 17 mois post injection (Mount *et al.*, 2002). D'autres études, réalisées chez le primate non-humain, conduisirent également à une expression thérapeutique de facteur IX pendant plus de 2 ans, à une dose de 4.2×10^{12} pv/kg. L'utilisation de nouveaux vecteurs AAV, dits « self complementary », permit de diminuer la dose nécessaire à 1×10^{12} pv/kg. Dans cette dernière étude, la correction fut suivie pendant plus de 9 mois (Nathwani *et al.*, 2002 ; Nathwani *et al* 2009).

Ces résultats dans des modèles animaux, très encourageants, conduirent à la mise en place de 5 essais cliniques de phase I entre 1998 et 2001. Ces essais utilisaient des vecteurs rétroviraux (Powell *et al.*, 2003), adénoviraux (Chuah *et al.*, 2004), AAV (2 essais, Kay *et al.*, 2000 ; Manno *et al.*, 2003), ou non viraux (Roth *et al.*, 2001).

L'injection de vecteurs rétroviraux à des doses comprises entre 2.7×10^7 et 4.4×10^8 pv/kg ne permit qu'une expression faible de facteur VIII à long terme (Kay *et al.*, 2000 ; Murphy *et al.*, 2008).

Le déclenchement d'une réaction inflammatoire chez le premier patient inclus dans le protocole utilisant des adénovirus recombinants, injecté à 4.3×10^{10} pv/kg, conduisit à l'arrêt prématuré de cette étude (Chuah *et al.*, 2004).

Un essai clinique de phase I/II réalisé en 1999 afin de tester la sécurité des vecteurs AAV en intra-musculaire, ne montra pas de toxicité à 7 ans post injection. Cependant, un problème majeur fut mis en évidence, à savoir que les taux de transduction nécessaires pour obtenir un bénéfice thérapeutique significatif, étaient très élevés. (Manno *et al.*, 2003 ; Jiang *et al.*, 2006).

Lors du second essai clinique utilisant des AAVr, les doses injectées par la veine porte (8×10^{10} ou 4×10^{11} pv/kg) furent insuffisantes pour obtenir une expression détectable de facteur. Un des deux patients injectés à 2×10^{12} pv/kg montra cependant un pic d'activité pro-coagulante de 11% à 2 semaines post injection. Par la suite, cette activité enzymatique diminua jusqu'à atteindre niveau basal, tandis qu'une élévation transitoire des AST/ALT était observée. Aucun anticorps dirigé contre le facteur IX ne fut détecté (Manno *et al.*, 2006). Contrairement aux animaux utilisés dans les essais précliniques, l'Homme peut être infecté naturellement par l'AAV2 sauvage. Cette infection, réalisée généralement en association avec un adénovirus, entraîne une activation du système immunitaire et la production de lymphocytes T CD8+ dirigés contre le virus « helper » et contre l'AAV. Lors de l'essai clinique sur l'hémophilie B, l'administration d'AAV recombinants a entraîné une réponse cytotoxique due à la réactivation de ces lymphocytes mémoires et la production d'anticorps dirigés contre les protéines de la capside virale.

2.4. Maladie de Crigler-Najjar

La maladie de Crigler-Najjar de type 1 est due à des mutations dans le gène *ugt 1* qui code l'UDP-glucuronosyltransferase de type 1, ou UGT1A1. La majorité des vecteurs de thérapie génique viraux ou non viraux disponibles ont été testés chez le rat Gunn, modèle animal de cette pathologie, par notre laboratoire ou d'autres équipes. Certaines approches ont ainsi permis une diminution importante de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn à long terme (Miranda et Bosma, 2009). Les stratégies utilisées seront vues en détails dans le chapitre 2 de cette introduction. Au cours de ma thèse, j'ai étudié la correction de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn à l'aide de vecteurs AAV. Les résultats seront détaillés dans la deuxième partie de ce mémoire.

Chapitre 2 : La maladie de Crigler-Najjar, un modèle pour la thérapie génique dans le foie

La maladie de Crigler-Najjar de type 1 (MIM 218800) est une maladie autosomique récessive décrite pour la première fois en 1952 par les Docteurs Crigler et Najjar (Crigler et Najjar, 1952). Elle est extrêmement rare, son incidence étant d'une naissance sur un million. Elle est due à un déficit en Bilirubine UDP-Glucuronosyl Transférase (UGT1A1 ou B-UGT1 ; EC 2.4.1.17), une enzyme catalysant le métabolisme de la bilirubine. L'absence d'activité de cette enzyme se traduit par un ictère intense à bilirubine non conjuguée, pouvant être fatal (Labrune, 2004).

I. Le complexe *ugt 1*

Le locus *ugt 1* est un complexe multigénique de plus de 100 kb situé à l'extrémité télomérique du chromosome 2, en q37 (MIM 191740). Il permet la synthèse de différentes isoformes d'UDP-Glucuronosyl Transférases (UGTs) par épissage alternatif (Figure 8).

Les exons 2 à 5 sont situés dans la partie 3' du complexe *ugt 1*, et codent la région carboxy-terminale de l'enzyme. Cette structure, composée de 246 acides aminés, est identique pour toutes les isoformes. Il existe également au moins une dizaine d'exons 1, notés 1*1 à 1*10. Ils sont situés dans la région 5' du complexe *ugt 1*, et possèdent chacun un promoteur interne spécifique avec un motif TATA box. Ces exons codent la région amino-terminale de 285 acides aminés spécifique à chaque UGT. Ainsi, l'exon 1*1 permet la synthèse du site de liaison à la bilirubine. L'assemblage des exons 1*1 et 2 à 5 va permettre la synthèse d'une UGT1A1 fonctionnelle majoritaire. Il est également possible de synthétiser une autre isoforme, plus rare, grâce à l'association des exons 1*4 et 2 à 5. Les exons 1*6 et 1*7, chacun associé aux exons 2 à 5, conduisent à la synthèse de deux isoformes de glucuronidation phénolique.

On dénombre actuellement 103 anomalies de séquence dans le gène UGT1A1, pouvant induire soit la maladie de Gilbert, soit la maladie de Crigler-Najjar de type I ou II. Parmi ces anomalies on dénombre 60 mutations faux-sens, 13 mutations non-sens, 18

petites délétions, 3 petites insertions, 2 insertions/ délétions, 1 duplication, et 6 mutations d'épissage (Petit, 2008).

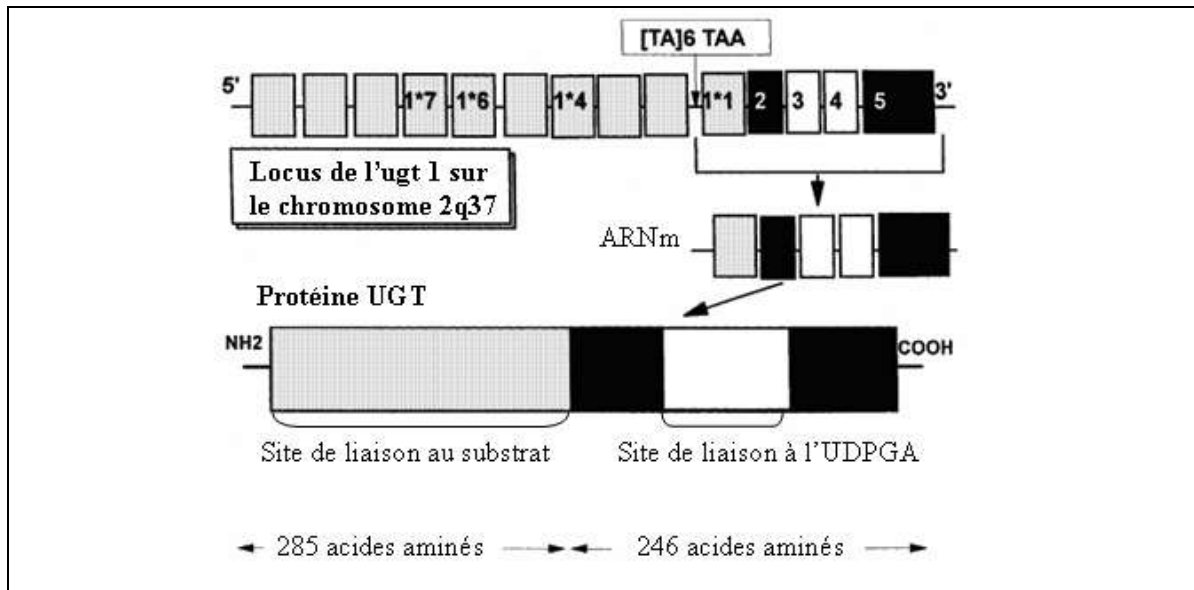


Figure 8. Organisation du complexe multigénique *ugt 1* (d'après Jansen et al., 1999). Le gène *ugt1* est situé en position q37 du chromosome 2. Il mesure plus de 100kb, et permet la synthèse de toutes les (UDP-Glucuronosyl Transférases). La région 3' comporte les exons 2 à 5, communs à toutes les UGTs. La région 5' contient au moins une dizaine d'exons 1, qui codent le site de liaison au substrat, propre à chaque UGT. Ainsi, la synthèse des enzymes UGTs s'effectue par association entre un exon 1 spécifique et les exons 2 à 5, invariants. Par exemple, c'est l'exon 1*1 qui code le site de liaison à la bilirubine. La synthèse de l'UGT1A1 s'effectue par recombinaison entre les exons 1*1, 2, 3, 4 et 5.
UDPGA : UDP glucuronic acid

II. Physiopathologie

1. Métabolisme de la bilirubine

Chez l'Homme, le catabolisme de l'hème permet la synthèse de 250 à 400mg de bilirubine par jour. La majorité (70-80%) provient de la dégradation des érythrocytes, et le reste (20-30%) est issu d'une érythropoïèse inefficace, de la myoglobine, et d'enzymes contenant de l'hème. Les érythrocytes ont une durée de vie de 120 jours. Les cellules sénescents sont dégradées par les macrophages phagocytes au niveau de la rate et de la

moelle osseuse. La partie globine est dégradée en acides aminés, et l'hème est transformé en biliverdine grâce à l'hème oxygénase puis en bilirubine grâce à une réductase.

Cette bilirubine est hydrophobe, et doit être rendue hydrosoluble afin de pouvoir être éliminée de l'organisme. La bilirubine non conjuguée circulante se fixe tout d'abord à l'albumine plasmatique pour atteindre les hépatocytes. Ensuite, après dissociation du complexe, la bilirubine est transportée par la ligandine ou la protéine Z. Elle est ensuite conjuguée à une ou deux molécules d'acide glucuronique grâce à l'enzyme microsomale UGT1A1. Cette bilirubine est ainsi rendue hydrosoluble, et sera éliminée via la voie biliaire (Figure 9).

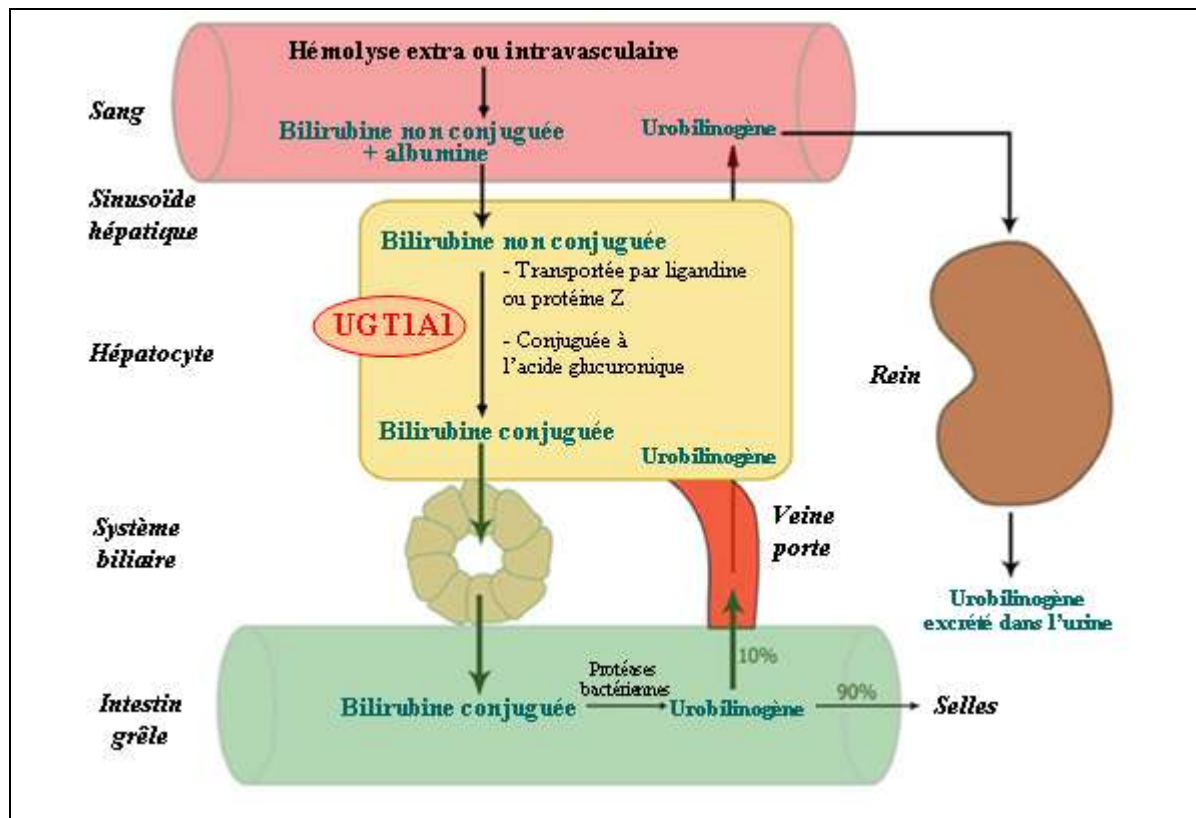


Figure 9. Métabolisme de la bilirubine (d'après le site internet <http://www.cornell.edu>).

La bilirubine provient principalement de la dégradation des érythrocytes (80%), mais également du catabolisme d'hémoprotéines ou d'une érythropoïèse inefficace (20%). La bilirubine libre est hydrophobe, ce qui empêche son élimination de l'organisme. Afin d'être rendue hydrosoluble, elle est conjuguée à 1 ou 2 molécules d'acide glucuronique. Cette réaction s'effectue dans les hépatocytes, grâce à l'enzyme UGT1A1. La bilirubine, conjuguée, devenue hydrosoluble, est alors excrétée via le système biliaire.

2. Défaut de glucuroconjugaison

Il existe différentes maladies métaboliques dues à l'accumulation de bilirubine non conjuguée dans le sérum, et aboutissant à des ictères plus ou moins graves. Elles sont classées en deux catégories : celles qui sont dues à un défaut d'excrétion de la bilirubine, et celles qui sont causées par une anomalie dans la glucuroconjugaison.

Les hyperbilirubinémies héréditaires dues à un problème d'excrétion de la bilirubine sont les syndromes de Dubin-Johnson et de Rotor. Elles se caractérisent par des niveaux élevés de bilirubine conjuguée dans le sérum, provoquant un ictère plus ou moins intense. Le syndrome de Dubin-Johnson (ou hyperbilirubinémie de type 2 ; MIM 237500) est une maladie autosomique récessive due à des mutations dans le transporteur canaliculaire responsable du transport de la bilirubine conjuguée vers la bile. C'est une affection peu grave, qui ne nécessite aucun traitement. Le syndrome de Rotor (MIM 237450) est une maladie récessive dont les causes moléculaires sont encore incertaines. Tout comme pour la maladie de Dubin-Johnson, cette affection est bénigne, et aucun traitement n'est nécessaire.

Les pathologies dues à un déficit en glucuroconjugaison sont la maladie de Gilbert et les maladies de Crigler-Najjar de type 1 et 2. La maladie de Gilbert (MIM 143500) est une affection assez fréquente, touchant 3 à 10% de la population. Elle est due à des mutations au niveau du promoteur du complexe *ugt1*. Elle se caractérise par un ictère à bilirubine non conjuguée peu sévère, ne nécessitant généralement aucun traitement. Dans de rares cas pathologiques, elle peut être traitée par du phénobarbital ou d'autres médicaments inducteurs d'enzymes microsomiales.

La maladie de Crigler-Najjar est induite par diverses mutations dans le complexe *ugt1*, provoquant un ictère intense à bilirubine non conjuguée, dès la naissance. La pathologie de type 2 (MIM 606785) est due à un déficit incomplet en enzyme UGT1A1, qui est inductible par le phénobarbital. Dans le cas de la maladie de Crigler-Najjar de type 1, le défaut de glucuroconjugaison est complet, et ne peut pas être traité par le phénobarbital. L'absence totale d'enzyme UGT1A1 induit une accumulation de bilirubine non conjuguée dans le sérum. Les liaisons avec l'albumine sont alors saturées, et la bilirubine en excès se trouve libre de traverser les membranes cellulaires. Le risque est l'accumulation de

bilirubine libre non conjuguée au niveau du système nerveux central, ou ictère nucléaire. Actuellement, les seuls traitements de cette pathologie sont la photothérapie et la transplantation hépatique.

III. Traitements actuels de la maladie de Crigler-Najjar de type 1

1. Photothérapie

La thérapie actuelle de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 repose sur la photothérapie. Cette technique permet la transformation de la bilirubine en lumirubine et autres photoisomères hydrosolubles, qui pourront être excrétés via les voies urinaire et biliaire (Agati *et al.*, 1998). C'est une technique très contraignante, qui nécessite le maintien sous lampes bleues pendant 10 à 12 heures par jour. De plus, son efficacité diminue au fur et à mesure que le patient grandit, en raison de l'épaississement cutané, d'une pigmentation plus intense de la peau, et de la diminution du ratio surface/poids du corps. A l'heure actuelle, le seul traitement curatif de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 reste la transplantation hépatique.

2. Transplantation hépatique

La transplantation hépatique est le seul traitement radical de la maladie de Crigler-Najjar de type 1. Cependant, cette stratégie est limitée par le manque de donneurs. Une alternative consiste en une transplantation d'hépatocytes. Des études réalisées chez des patients atteints de la maladie ont montré que seuls 2% de la masse hépatocytaire sont nécessaires pour une conjugaison adéquate de la bilirubine. Ceci correspond à environ 5 à 10% d'activité enzymatique (Schauer *et al.*, 2003 ; Fox *et al.*, 1998).

L'absence de traitement curatif efficace contre la maladie de Crigler-Najjar fait de cette pathologie une bonne candidate pour la thérapie génique. Ainsi, la maladie de Crigler-Najjar de type 1 a servi de modèle dans de nombreux essais chez l'animal, car :

- C'est une maladie extrêmement grave, sans traitement curatif.
- Un seul gène, *ugt 1*, est impliqué. De plus, il ne nécessite pas de régulation car le produit du transgène n'est pas toxique.
- L'histologie hépatique est normale, et les fenestrations permettent l'accès des hépatocytes aux vecteurs de transfert de gènes.
- L'évaluation de la correction est facile, grâce au dosage de la bilirubine et des dérivés conjugués dans le sérum et la bile.
- Il existe un modèle animal: le rat Gunn, découvert en 1938 au sein d'une colonie Wistar (Gunn 1938).

IV. Thérapie génique chez le rat Gunn

La première étude de faisabilité consistait en la transfection d'un plasmide codant l'UGT1A1 humaine dans des hépatocytes de rat Gunn *in vitro*, qui induisit une restauration de la capacité de glucuronidation de ces cellules (Wilke *et al.*, 1997). De nombreuses études réalisées ensuite chez le rat Gunn par des approches *in vivo* et *ex vivo*, ont permis de tester les vecteurs viraux ou non viraux disponibles en thérapie génique.

1. Utilisation de vecteurs non viraux

Le ciblage des hépatocytes par vecteurs synthétiques est possible grâce à l'utilisation d'asialoorosomucoïde, un ligand spécifique du foie (Wu et Wu, 1988). Cependant, ce système est peu efficace, car le complexe peut être dégradé au niveau de l'endosome. La voie endosomale peut être inhibée par agents endosomolytiques, par dépolymérisation des microtubules, ou par hépatectomie partielle (Chowdhury *et al.*, 1996). Cette stratégie non virale est plus efficace si un composé endosomolytique et un agent de dépolymérisation des microtubules sont associés. Une autre amélioration consiste à créer un système hydrodynamique, permettant ainsi un meilleur taux de transduction des hépatocytes.

Cependant, toutes ces techniques sont transitoires et/ou nécessitent des drogues ou des techniques chirurgicales lourdes, comme l'hyperpression. Elles doivent donc être

améliorées avant d'être applicables à l'Homme. A l'heure actuelle, les stratégies de transfert de gènes par des vecteurs viraux restent donc les plus prometteuses.

2. Utilisation de vecteurs viraux

2.1. Adénovirus

L'utilisation de vecteurs adénoviraux chez le rat Gunn adulte ne permet qu'une persistance du transgène à court terme, due au déclenchement d'une réponse immunitaire contre le vecteur. Par exemple, des vecteurs adénoviraux furent injectés dans la veine porte de rats Gunn adultes, à une dose de 5×10^9 pfu (plaque-forming units) / kg. Ceci induisit un taux d'UGT1A1 humaine maximale à J3, mais qui diminua ensuite progressivement, sur une durée d'environ 7 semaines (Askari *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1998).

Une tolérance vis-à-vis de ce type de vecteur peut être induite par différentes stratégies. Tout d'abord, il est possible d'injecter des animaux nouveau-nés, dont le système immunitaire est immature. Ceci permet également une réinjection ultérieure (Takahashi *et al.*, 1996). Dans le cas d'animaux adultes, une injection intrathymique d'antigènes d'adénovirus de type 5 permet aussi une expression stable du transgène, pendant au moins 7 semaines (Ilan *et al.*, 1996). L'administration orale d'antigènes viraux (Ilan *et al.*, 1998), ou l'expression de la protéine immuno-modulatrice CTLA4Ig (Thummala *et al.*, 2002) conduisent à la persistance à long terme du transgène, et à la possibilité de réinjection.

Cependant, toutes ces stratégies nécessitent des traitements lourds, difficilement applicables en clinique. Des vecteurs adénoviraux plus efficaces ont donc été étudiés. Ce sont les adénovirus adénoviraux « gutless », sans séquences codantes virales. Une seule injection de ces vecteurs chez des rats Gunn âgés de 8 semaines, à une dose de 3×10^{12} pv/kg, permet la correction définitive de la pathologie (Toietta *et al.*, 2005).

2.2. Onco-rétrovirus et lentivirus

Le principal problème des onco-rétrovirus est qu'ils ne transduisent pas les cellules quiescentes. Il faut donc provoquer la division du foie chez l'animal adulte, le plus souvent par hépatectomie partielle (Branchereau *et al.*, 1993 ; Tada *et al.*, 1998). Toutefois, ce type de vecteur peut induire une réponse immunitaire, et la perte rapide d'expression du transgène (Aubert *et al.*, 2002).

Des études *ex vivo* ont été réalisées chez le rat Gunn adulte, en induisant la prolifération des hépatocytes en culture grâce à l'antigène thermosensible T de SV40. Les hépatocytes, transduits par des onco-rétrovirus recombinants portant l'ADNc de l'UGT1A1 humaine, furent ensuite réinjectés chez le rat Gunn après irradiation et/ou hépatectomie partielle (Kawashita *et al.*, 2008). Ce protocole a permis la correction à long terme du rat Gunn. Il est cependant très lourd, et présente des risques tumorigènes élevés dus à l'utilisation de l'antigène T de SV40. Il n'est donc pas applicable sous cette forme chez l'Homme.

L'injection néonatale de vecteurs rétroviraux s'est avérée efficace chez le rat Gunn nouveau-né. Cette expérimentation, réalisée dans notre laboratoire, consista en une injection unique de vecteurs onco-rétroviraux murins (1×10^8 particules infectieuses / rat) ou lentiviraux (5×10^8 particules infectieuses / rat) porteurs de l'ADNc de l'UGT1A1 humaine, dans la veine temporale de rats Gunn âgés de 1-2 jours (Bellodi-Privato *et al.*, 2005). Ceci permit la correction complète de l'hyperbilirubinémie dès 6 semaines, encore persistante au moment du sacrifice, à 95 semaines. L'efficacité des vecteurs fut notamment montrée par la présence de dérivés de bilirubine conjuguée dans la bile (Nguyen *et al.*, 2007, en Annexe).

Dans une autre étude, l'injection de vecteurs lentiviraux codant l'UGT1A1 humaine permit une correction transitoire de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn nouveau-né ou chez des embryons âgés de 19 jours. Les taux de bilirubine sérique diminuèrent transitoirement, puis ré-augmentèrent en 18 semaines chez les animaux injectés à J1, et en 60 semaines pour les embryons. Des anticorps anti-UGT1A1 furent détectés, indiquant une forte réponse immunitaire. D'autres vecteurs codant la protéine GFP (green fluorescent

protein) n'induisirent pas de production d'anticorps, suggérant ainsi que l'immunogénicité observée précédemment était due à la enzyme UGT1A1 humaine (Seppen *et al.*, 2006a).

Le déclenchement d'une réponse immunitaire peut être évitée grâce à l'utilisation d'un promoteur foie spécifique (Nguyen *et al.*, 2005 et 2007 ; Van der Wegen *et al.*, 2006). Une seconde stratégie consiste à insérer des séquences cibles de miRNA dans le génome des vecteurs viraux, telles que la séquence cible du miR-142-3p. Comme décrit précédemment, ces structures permettent la reconnaissance de leur séquence cible, uniquement présente dans les cellules du système immunitaire. Ainsi, l'expression du transgène est inhibée spécifiquement dans ces cellules, empêchant ainsi la reconnaissance de la protéine étrangère par des cellules présentatrices d'antigène (Brown *et al.*, 2006). Les autres types cellulaires, tels que les hépatocytes, ne possèdent pas la séquence cible, et expriment donc le transgène à long terme.

2.3. AAV

L'injection de vecteurs AAV codant l'UGT1A1 humaine chez des rats Gunn adultes conduisit à une diminution significative et à long terme de l'hyperbilirubinémie. Les vecteurs furent injectés à une dose comprise entre 2.5 et 5×10^{12} pv/kg, dans la veine porte de rats âgés de 6 à 8 semaines. Le test de différentes constructions virales indiqua un net avantage pour les AAV de sérotype 1, comparés aux AAV2, 6 ou 8 (Seppen *et al.*, 2006b).

Cependant, la dose utilisée était la même que celle utilisée en essai clinique pour le traitement de l'hémophilie B, et qui avait induit une réponse immune chez les patients. Il est donc nécessaire d'améliorer ce type de vecteur avant de pouvoir réaliser un essai clinique chez des patients atteints de la maladie de Crigler-Najjar de type 1. L'utilisation de vecteurs AAVsc, ou « self complementary », est très intéressante car les doses virales nécessaires sont plus faibles qu'avec des AAV classiques. Une étude détaillée de ce type de vecteurs est présentée dans le chapitre suivant. Nous avons utilisé des AAVsc pour le traitement de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn adulte. Les résultats obtenus sont très encourageants, et figurent dans la deuxième partie de ce mémoire.

Chapitre 3 : Les virus adéno-associés (AAV)

Les virus adéno-associés (AAV) appartiennent à la famille des Parvoviridae et au genre des Dependovirus. Ils ont été découverts en 1965 par Atchison comme contaminants d'une préparation adénovirale (Atchison *et al.*, 1965). Ce sont de petits virus non enveloppés, possédant une capside icosahédrique d'environ 25 nm de diamètre. Leur génome est constitué de deux séquences terminales répétées inversées (ITR) encadrant une molécule d'ADN simple brin de 4.7 kb.

I. Génome de l'AAV sauvage

1. Séquences ITR

Les deux séquences ITR sont chacune constituées de 145 pb. Les 125 premiers nucléotides forment un palindrome et sont repliés en forme de T. Les autres nucléotides forment la séquence D. Les séquences ITR contiennent les sites RBS (Rep Binding Site) et TRS (Terminal Resolution Site), et servent d'origine pour la réplication virale (Figure 10C).

2. Gènes Rep et Cap

Le génome à ADN simple brin des virus AAV est composé de deux cadres ouverts de lecture (ORF, Open Reading Frame), constitués des deux gènes *Rep* et *Cap* (Figure 10A). Le cadre ouvert de lecture en 5' contient le gène *Rep*, qui permet la production de quatre protéines : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Les protéines Rep 68 et 78 sont synthétisées à partir du promoteur p5 par épissage alternatif (Rep68) ou non alternatif (Rep78). Ce sont des protéines régulatrices qui jouent un rôle important dans le cycle viral, notamment dans la réplication de l'ADN. Les protéines Rep 52 et 40 sont obtenues à partir du promoteur p19, par l'intermédiaire de transcrits épissé (Rep40) ou non (Rep52). Elles ont un rôle dans l'accumulation d'ADN viral simple brin avant l'étape d'encapsidation. Toutes les protéines Rep ont une fonction hélicase et ATPase. Les protéines Rep 68 et 78

II. Cycle viral de l'AAV sauvage ou recombinant

1. AAV sauvage

Les AAV sont des virus défectifs : ils ont besoin d'un virus « helper », tel qu'un adénovirus (Ad) ou le virus de l'herpès (HSV), pour répliquer leur génome dans la cellule cible (Figure 11). En absence de virus « helper », l'AAV sauvage s'intègre dans le génome de la cellule hôte et persiste à l'état de dormance. Ce phénomène est réversible, et le cycle lytique peut être réactivé lors d'une future co- infection adénovirale. Les AAV sont réputés pour être non pathogènes chez l'Homme. Une infection par ces virus n'entraîne généralement aucun symptôme.

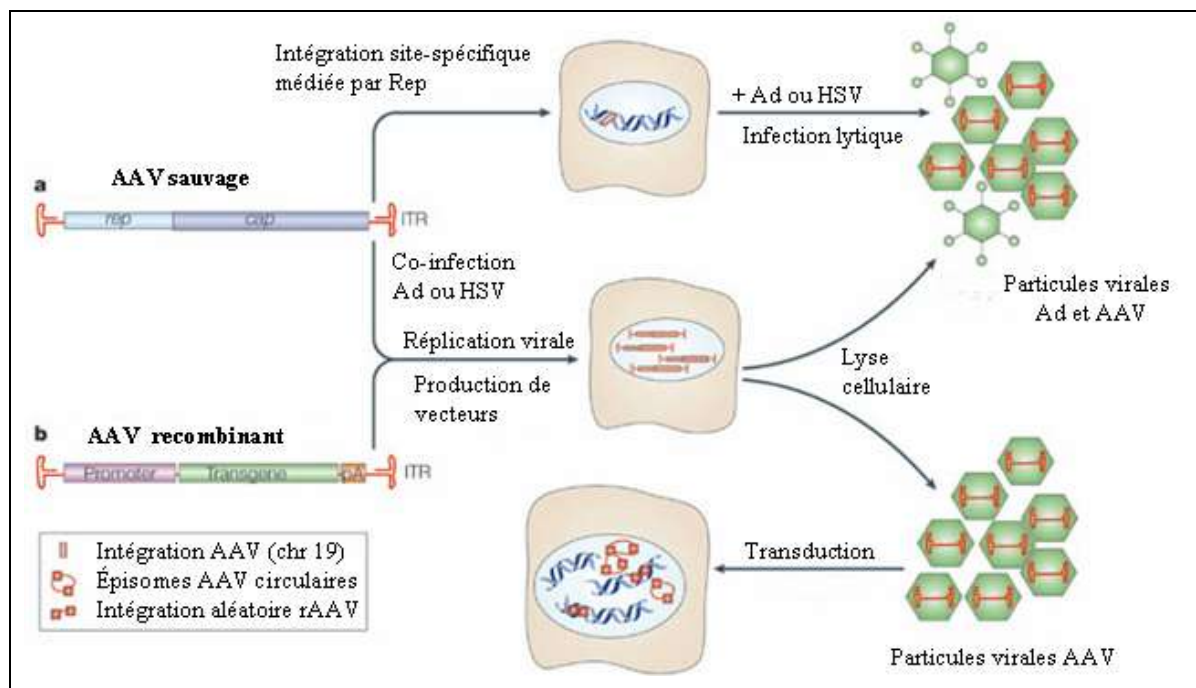


Figure 11. Cycle viral de l'AAV sauvage ou recombinant (d'après Vasileva et Jessberger, 2005). L'AAV sauvage s'intègre en un locus spécifique du chromosome 19 humain, où il persiste à l'état latent (a). Une co-infection par un virus auxiliaire tel qu'un adénovirus (Ad) ou le virus de l'herpès simplex (HSV), permet d'activer le cycle lytique de l'AAV (a). Les vecteurs dérivés des AAV ne possèdent plus les gènes Rep et Cap, remplacés par un promoteur, le gène d'intérêt, et une séquence de polyadénylation. Les protéines virales (AAV et virus auxiliaire) nécessaires à la production des particules d'AAVr sont apportées en trans (b). Les AAV recombinants persistent majoritairement à l'état d'épisomes. Toutefois, une intégration aléatoire est parfois possible.

L'AAV sauvage est le seul virus à ADN de mammifère capable de s'intégrer au niveau d'un site spécifique dans le génome de sa cellule hôte, chez l'Homme. Cette région est située dans la zone q13.4 du chromosome 19, notée AAVS1. Elle présente une homologie partielle avec l'ITR, et possède en particulier le site de fixation des protéines Rep (RBE) et un site de clivage *trs* (terminal resolution site). Les composants nécessaires viraux nécessaires à cette intégration sont les deux ITR, les protéines Rep 78 ou 68, et la séquence IEE (integration efficiency element) à l'intérieur du promoteur P5 (Daya et Berns, 2008).

2. AAV recombinant

Les cellules-cibles peuvent être transduites par des AAV recombinants simple brin (AAVr sb) de polarité positive ou négative. La première étape du cycle viral est la formation de structures linéaires double brin (db), le plus souvent par hybridation entre deux molécules de polarités complémentaires, ou plus rarement par synthèse du second brin par l'ADN polymérase cellulaire. C'est une étape cruciale du cycle, car les AAV sb sont rapidement éliminés par la cellule. Les AAV db néo-synthétisés sont peu stables sous forme linéaire, sont ensuite circularisés ou dégradés (Wang *et al.*, 2007). Ils peuvent être convertis en molécules circulaires monomériques, puis dimériques, grâce à des phénomènes de recombinaison entre les ITR. Les dimères peuvent ensuite s'associer en plus grandes structures appelées concatémères, qui vont rester sous forme d'épisomes, ou vont s'intégrer dans le génome de la cellule-cible. Les phénomènes impliqués dans la constitution de concatémères sont encore à l'étude (flèches pointillées sur la figure 12). Toutes les formes double brins intervenant dans le cycle des AAV recombinants sont transcriptionnellement actives, et peuvent donc induire l'expression du transgène. Cependant, la ou les structure(s) permettant une expression efficace et stable à long terme n'est pas encore formellement identifiée (Nakai *et al.*, 2000).

Il est cependant à noter que la majorité des vecteurs AAV restent à l'état d'épisomes, tandis que les phénomènes intégratifs semblent relativement rares. Ainsi, des formes intégrées ont pu être détectées après injection d'AAVr dans le foie (Cunningham *et al.*, 2008 ; Inagaki *et al.*, 2008) , mais pas dans le muscle (Penaud-Budloo *et al.*, 2008). Lors de ma thèse j'ai étudié une hypothétique intégration des vecteurs AAV administrés à

de jeunes rats Gunn ou Wistar. Les résultats ont fait l'objet d'un article, et seront présentés dans la seconde partie de ce mémoire.

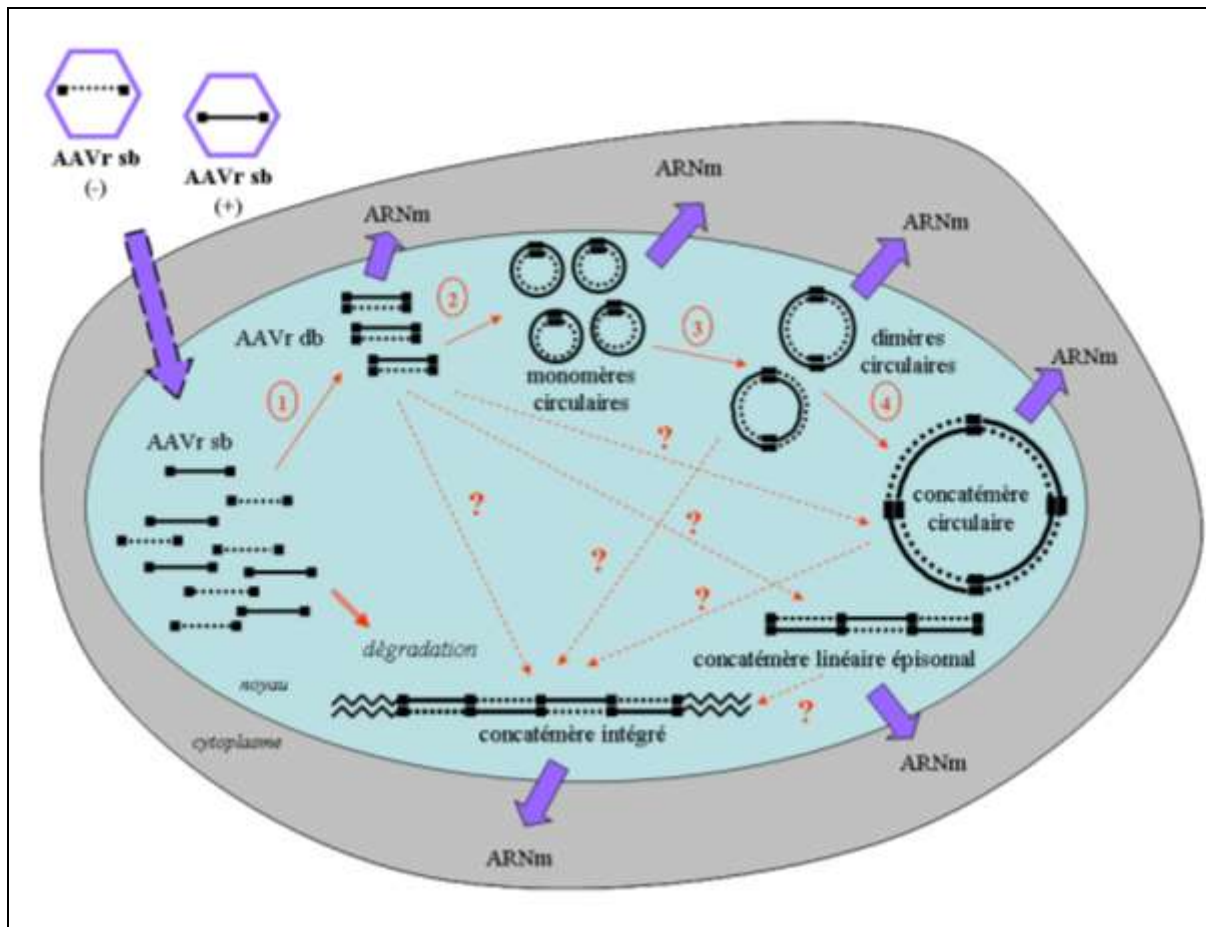


Figure 12. Structures moléculaires de l'AAV recombinant (d'après Nakai et al, 2000). Les AAV recombinants entrent dans la cellule cible sous une forme simple brin, de polarité positive ou négative. Ils sont ensuite convertis en molécules linéaires double brin, une étape cruciale pour la transduction des vecteurs AAV (1). Ces structures sont circularisées grâce à des phénomènes de recombinaison au niveau des ITR (2). Les structures peuvent ensuite s'associer entre elles pour produire des dimères (3) ou des concatémères (4). Les étapes permettant la formation de concatémères intégrés ne sont pas clairement connues. Les hypothèses émises dans différentes études sont représentées en pointillés. Toutes les formes double brin intervenant dans le cycle des AAVr sont transcriptionnellement actives. Cependant, la ou les forme(s) permettant l'expression du transgène à long terme dans le foie ne sont pas encore clairement établies.

III. Risques d'intégration et de tumorigenèse liés aux vecteurs AAV

Chez les mammifères, l'AAV2 sauvage s'intègre au niveau du site spécifique AAVS1, localisé en position q13.4 du chromosome 19 (Kotin *et al.*, 1990 ; Samulski *et al.*, 1991). Cette intégration s'effectue par un mécanisme de recombinaison non homologue nécessitant la présence des 2 ITR, de la séquence IEE (integration efficiency element), et des protéines virales Rep 68 et 78.

Les vecteurs dérivés des AAV n'ont plus cette spécificité d'intégration. Il semblerait cependant qu'ils puissent parfois s'intégrer dans le génome des cellules cibles, *in vitro* ou *in vivo*, mais de façon aléatoire (Ponnazhagan *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Ces phénomènes intégratifs, mêmes rares, induisent un risque de mutagenèse insertionnelle. Une étude réalisée dans le modèle murin de la mucopolysaccharidose de type VII a montré la formation de tumeurs hépatiques après injection de 1.5×10^{11} particules virales chez la souris nouveau-née. Des analyses par PCR ont indiqué une surexpression d'AAVr dans le tissu tumoral, contre moins de 1 copie par 100 génomes diploïdes dans le parenchyme sain environnant. Des phénomènes intégratifs ont été localisés, préférentiellement dans le chromosome 12, au niveau de la région-cible du miRNA-341. De plus, les gènes proches de ces sites intégratifs étaient surexprimés (Donsante *et al.*, 2007). D'autres expérimentations ont également mis en évidence des phénomènes intégratifs dans le foie de souris injectées à la naissance, qui permettaient une expression à long terme du transgène au niveau de certains hépatocytes. Toutefois, dans ce cas l'intégration n'était pas localisée à proximité du locus miRNA-341 (Cunningham *et al.*, 2008 ; Inagaki *et al.*, 2008). Ces phénomènes d'intégration et de tumorigenèse n'ont pas été retrouvés dans d'autres études, et pourraient donc être dus à certaines pathologies ou à certains modèles animaux très particuliers (Bell *et al.*, 2005 ; Bell *et al.*, 2006).

Des hypothèses concernant les mécanismes qui permettent l'intégration de l'AAV recombinant semblent impliquer des cassures dans l'ADN génomique de la cellule-hôte (Figure 13). Malgré cela, il n'a pas encore été établi de site intégratif préférentiel pour l'AAVr. Le risque de surexpression aléatoire de proto-oncogènes n'est donc pas à exclure, comme ce fut le cas pour les vecteurs onco-rétroviraux. C'est une hypothèse à vérifier dans les futurs protocoles de thérapie génique utilisant les vecteurs AAV. C'est d'autant plus

important pour les essais ciblant le foie, car pour l'instant les phénomènes intégratifs n'ont été observés que dans cet organe, et pas dans d'autres comme le muscle par exemple (Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

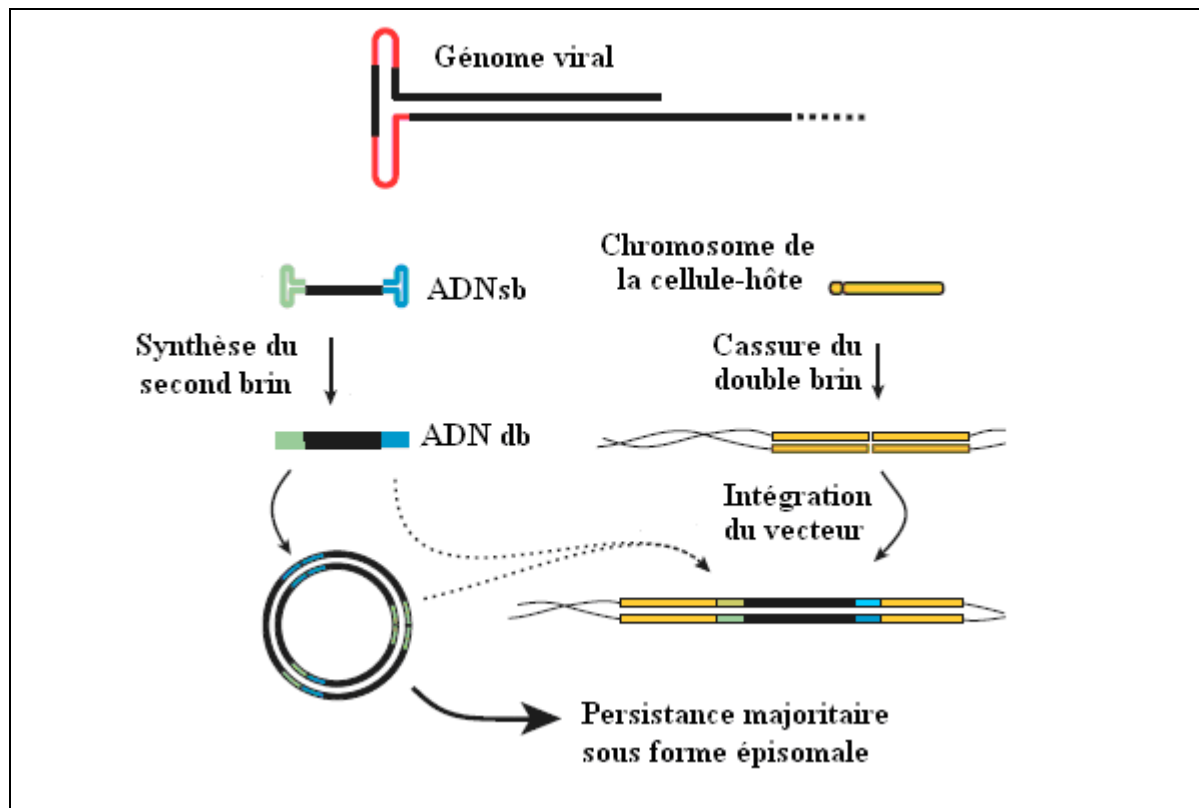


Figure 13. Intégration possible des AAV recombinants dans le génome de leur cellule-hôte (d'après Schultz et Chamberlain, 2008) L'ADN simple brin est converti en double brin par synthèse du second brin d'ADN, ou par hybridation entre deux AAV simple brin de polarité complémentaire. Les structures double brin s'associent ensuite pour former des concatémères, qui persistent le plus souvent à l'état d'épisomes. De rares phénomènes intégratifs sont possibles, probablement au niveau de cassures dans l'ADN génomique des cellules cibles.

ADNs b : ADN simple brin ; ADNdb : ADN double brin

IV. Sérotypes et tropisme

Il existe douze sérotypes d'AAV chez l'Homme et plus d'une centaine chez le primate non-humain (Daya et Berns, 2008). Les sérotypes 1, 2, 3, 4, 6 et 12, ont été découverts à partir de préparations adénovirales, tandis que tous les autres ont été isolés à

partir de tissus humains ou simiens. Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique sont les sérotypes 1 à 9.

Le tropisme des AAV est dû à certaines protéines de la capside virale, qui reconnaissent spécifiquement des récepteurs au niveau de la membrane cellulaire des différents tissus. Par exemple, l'AAV de sérotype 2 se lie aux protéines HSPG (heparan sulfate proteoglycan), présentes à la surface de nombreux types cellulaire, ce qui lui confère un large tropisme (Summerford et Samulski, 1998).

Tableau 4. Tropisme des principaux sérotypes d'AAV utilisés en thérapie génique (d'après Wu et al., 2006 ; Büning 2008)

		Sérotypes d'AAV								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tissus-cibles préférentiels	Cœur	+					+		+	+
	Endothélium vasculaire	+								
	Foie	+				+			+	+
	Muscle squelettique	+					+	+	+	+
	Œil		+		+	+				
	Oreille interne			+						
	Pancréas	+							+	
	Poumon					+	+			+
	Rein		+							
	Système nerveux central	+			+	+				

+ : sérotype AAV le plus adapté à ce tissu

Dans le cas des AAV recombinants, il est également possible d'améliorer ce tropisme naturel en plaçant le transgène sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique tel que le desmine pour le muscle squelettique, ou le mTTR (murin transthyretin) pour le foie.

V. Production d'AAV recombinants

La procédure classique pour la production de vecteurs AAV consiste en une co-transfection transitoire de cellules 293 par deux plasmides : l'un contenant les ITR et le transgène, l'autre portant les séquences *Rep* et *Cap*. Dans les premiers protocoles, les séquences adénovirales nécessaires étaient apportées grâce à l'infection par un adénovirus. Plus récemment, on a remplacé cette étape par l'utilisation d'un plasmide « helper » contenant ces séquences adénovirales (E1, E2 et E4), ou par des cellules 293 exprimant E1. Ainsi, les lots d'AAV produits sont exempts de toute particule adénovirale. Les titres viraux obtenus par cette méthode de production étant relativement faibles, des améliorations ont été apportées, telles que le développement de lignées stables productrices Hela, ayant intégré les gènes *Rep* et *Cap* dans leur génome.

Un nouveau système de production, basé sur l'utilisation de cellules d'insectes co-infectées par des baculovirus, est développé actuellement. Cette technique consiste à faire exprimer les protéines virales AAV par des virus à ADN, les baculovirus. Tout ce système de production s'effectue dans des cellules d'insecte. Les rendements sont élevés et permettent des productions à grande échelle. Cette technique est également très sûre, car les baculovirus se répliquent uniquement dans des cellules d'insecte (Merten *et al.*, 2005 ; Virag *et al.*, 2009).

VI. Stratégies d'amélioration des vecteurs AAV

De nouveaux outils ont été développés afin d'améliorer les fonctionnalités des vecteurs AAV. Des modifications au niveau de la capside permettent l'amélioration du tropisme grâce à l'utilisation des caractéristiques propres à chaque sérotype, tels qu'un tropisme particulier. D'autres techniques ont pour but l'augmentation de la capacité d'encapsulation, par trans-épissage, ou l'amélioration de la cinétique d'expression du transgène, ce sont les AAV « self complementary » (sc).

1. Changements au niveau de la capside

Certaines stratégies d'amélioration des vecteurs AAV ciblent la capside et sont basées sur l'utilisation d'un plasmide contenant les ITR de l'AAV-2 associé à un ou plusieurs plasmides possédant les gènes *Rep* et *Cap* d'autres sérotypes (Figure 14).

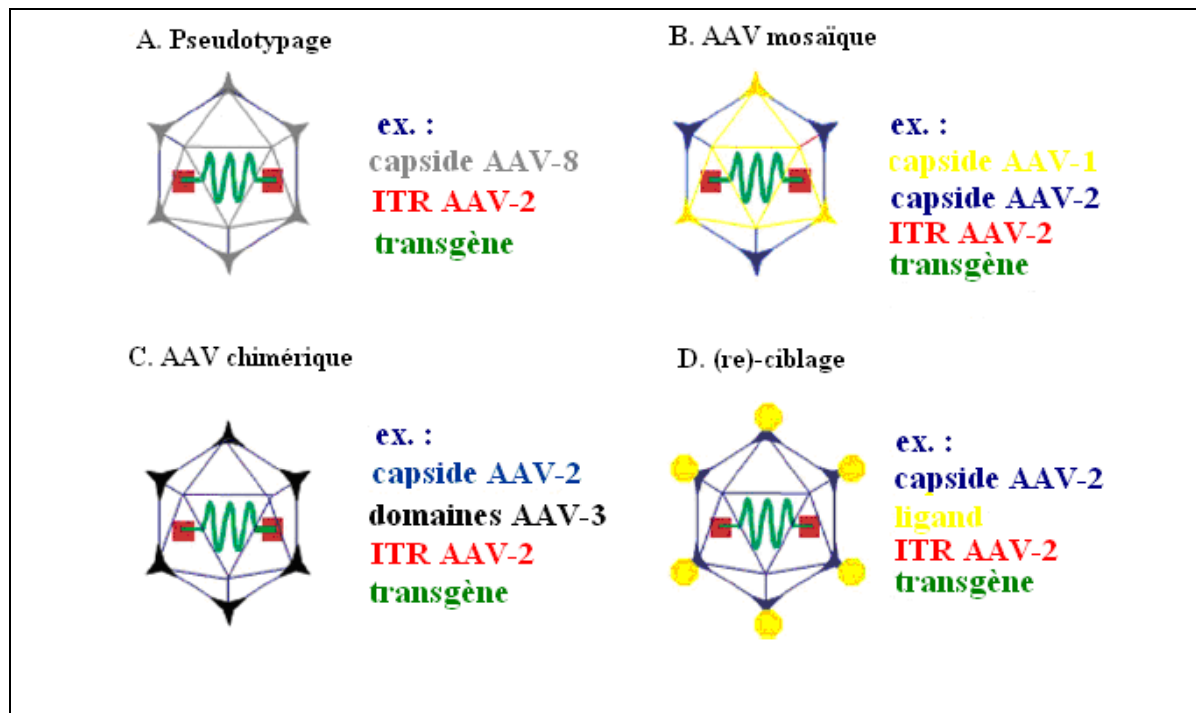


Figure 14. Techniques d'amélioration des vecteurs AAV par modification de la capside (d'après Büning et al., 2008). Différentes stratégies sont possibles afin d'améliorer le tropisme des AAVr. Les premiers vecteurs AAV utilisés en thérapie génique étaient de sérotype 2. La technique de pseudotypage permet de modifier le tropisme initial de l'AAV2, grâce à l'utilisation des protéines de la capside d'un autre sérotype. Ceci conduit à la formation de vecteurs hybrides possédant les ITR de l'AAV-2, et le gène Cap d'un autre sérotype choisi (A). Il est également possible de synthétiser des AAVr portant à leur surface des protéines de 2 sérotypes différents, afin de combiner leurs tropismes (B et C). Enfin, une dernière méthode consiste à rajouter des ligands spécifiques à la surface des AAVr, tels que des facteurs de croissance. Ceci permet de cibler un type cellulaire précis, ou au contraire empêche la reconnaissance des vecteurs au niveau de certains récepteurs cellulaires.

1.1. Pseudotypage

L'AAV de sérotype 2 a été le premier étudié et utilisé pour la production de vecteurs recombinants. Cependant, il ne convient pas à tous les types cellulaires. La technique de pseudotypage a donc été développée. Elle est basée sur l'utilisation des nouveaux sérotypes d'AAV, qui ont des tropismes variés et sont donc mieux adaptés à de nombreux types tissulaires.

Le tropisme des AAV est déterminé par le gène *Cap*, et non par le gène *Rep* (Grimm *et al.*, 2006). La technique de pseudotypage va donc consister à produire des AAV hybrides possédant les ITR et le gène *Rep* de l'AAV2, mais le gène de la capsid d'un autre sérotype. Par exemple, il est ainsi possible d'obtenir des AAV 2/8, très efficaces dans le foie.

1.2. AAV mosaïque ou chimérique

Afin d'additionner les avantages des différents types d'AAV, il est également possible de former des vecteurs constitués de deux sérotypes différents. On peut ainsi produire des virions mosaïques constitués d'un ensemble de sous-unités VP de différents sérotypes (Kwon *et al.*, 2008). Par exemple, l'équipe de Xiao a fabriqué des AAV chimériques, grâce à l'utilisation de deux plasmides « helper » de sérotypes 1 et 2 lors de l'étape d'encapsidation. Les molécules formées possédaient un niveau d'expression *in vivo* similaire à celui de l'AAV-1 dans le muscle et à celui de l'AAV-2 dans le foie (Hauck *et al.*, 2003).

Les AAV chimériques sont dus à des recombinaisons homologues entre les séquences *Cap* de différents sérotypes. Leur production consiste à une co-transfection entre le plasmide AAV-2 possédant un gène *Cap* muté inactif, avec un plasmide possédant le gène *Cap* fonctionnel d'un autre sérotype.

Le principal inconvénient de ces deux types de vecteurs est qu'ils peuvent être reconnus par des anticorps dirigés contre les deux sérotypes, ce qui augmente donc le risque de réponse immunitaire.

1.3. Re-ciblage

Le large tropisme de certains sérotypes d'AAV peut parfois avoir des inconvénients, notamment lors d'une injection systémique. En effet, les vecteurs peuvent transduire des tissus ou des cellules non ciblées. Ceci peut entraîner un risque de toxicité ou de réponse immune, et diminuer également le rendement de transduction des cellules cibles.

Afin de palier ce problème, il existe deux techniques de re-ciblage de la capside. La première méthode, non génétique, consiste à utiliser des molécules spécifiques qui vont faire le lien entre les protéines de la capside virale et les récepteurs cellulaires ciblés. Dans une étude, les facteurs de croissance FGF (fibroblast growth factor) et EGF (epidermal growth factor) furent tout d'abord liés à la capside virale d'AAV2 par des interactions avidine/ biotine, *in vitro*. Ces complexes permirent ensuite une reconnaissance spécifique *in vivo* des cellules exprimant spécifiquement les récepteurs de ces facteurs de croissance (Ponnazhagan *et al.*, 2002). Dans la seconde technique de re-ciblage, le vecteur est modifié génétiquement au niveau de sa capside virale, grâce à l'incorporation d'une séquence permettant la reconnaissance spécifique d'un récepteur, ou au contraire visant à supprimer cette fonction de reconnaissance. Ainsi, des mutations dans les 5 acides aminés responsables du motif HSPG, empêche l'accrochage des AAV de sérotype 2 sur les cellules exprimant les récepteurs aux HSPG (Girod *et al.*, 1999).

2. Technique de trans-épissage

Un autre inconvénient des vecteurs AAV est leur faible capacité d'encapsulation. Elle est limitée théoriquement à 4.7 kb, ce qui correspond à la taille du génome viral. Des études ont toutefois montré qu'il était possible de produire des vecteurs AAV fonctionnels comprenant un transgène d'une longueur atteignant jusqu'à 140% du génome viral

(Grieger and Samulski, 2005; Wu *et al.*, 2007). Cependant, de nombreuses maladies sont dues à des lésions dans des gènes dont l'ADNc est de plus grande taille, ce qui ne permet pas l'utilisation de vecteurs AAV classiques pour le traitement de ces pathologies.

Récemment, la technique de trans-épissage a été adaptée aux AAVr. Le transgène est clivé en deux parties puis insérés dans deux vecteurs AAV complémentaires. Le premier AAVr contient le promoteur, la partie 5' du transgène, et un site donneur d'épissage (SD). Le second AAVr contient un site accepteur d'épissage (SA), la partie 3' du transgène, et le signal de polyadénylation (poly A). Après transduction de la même cellule-cible, les deux vecteurs forment un concatémère grâce à la recombinaison entre les deux ITR. Ensuite, les sites SD et SA sont épissés, pour aboutir à la formation d'un ARN messager actif, puis d'une protéine fonctionnelle (Ghosh *et al.*, 2007).

Cette technique, qui permet l'encapsulation de gènes jusqu'à 9 kb, a été testée chez la souris dans des modèles de pathologies musculaires telles que la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), ou la dystrophie musculaire congénitale. Des résultats encourageants ont été obtenus avec le gène de la mini-dystrophine chez la souris mdx, modèle animal de la DMD. L'administration d'AAV trans-épissé dans des souris de 2 mois induisit une expression de la mini-dystrophine d'environ 50% à 3 mois post injection, avec une amélioration significative des fonctions musculaires. L'injection des mêmes vecteurs chez des souris âgées de 1 an induisit des niveaux de transduction similaires. Toutefois, dans ce cas les corrections phénotypiques ne furent que minimales, peut être dues à un état trop avancé de la maladie (Lai *et al.*, 2005).

3. AAV « self complementary » (AAVsc)

L'étape limitante principale dans le cycle des AAV est la synthèse des doubles brins, soit par hybridation intermoléculaire entre deux AAV sb, soit par synthèse du brin complémentaire. Le développement de nouveaux types d'AAV, dits « self complementary » (ou auto complémentaires) a permis de surmonter ce problème (Figure 15). Les AAVsc ont une structure composée de la moitié du génome AAVr sous forme de génomes dimériques simples brins. Après transduction de la cellule cible, leur conformation inversée répétée leur permet de s'auto-assembler, et de former une molécule

double brin fonctionnelle, de façon totalement autonome (McCarty *et al.*, 2001 ; Gonçalves *et al.*, 2005).

L'avantage de ces vecteurs est qu'ils permettent une expression plus rapide et plus stable du transgène. L'efficacité de vecteurs AAVsc de sérotype 2 codant la GFP sous contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV) a été testée par injection systémique de 4.10^{11} pv chez la souris adulte. A 8 semaines post injection, plus de 30% des hépatocytes exprimaient la GFP, contre 1 à 2% seulement avec des AAsb. L'expression de GFP était faible dans les autres organes tels que le cœur, l'intestin ou le muscle (1 à 3%) avec les AAsc, et indétectable avec les AAVsb (Fu *et al.*, 2003).

Des vecteurs AAVsc de sérotype 7 ou 8, portant l'ADNc de la sous-unité β de l'hormone choriogonadotrope de macaque, sous contrôle du promoteur CMV/ β -actine, ont été développés. Des études préliminaires montrèrent que l'injections par la veine caudale de 1.5×10^{12} pv/kg, chez souris C57BL/6, permettait une expression du transgène de 2 à 3-log supérieure en comparaison aux AAVsc classiques. Des doses trois fois plus faibles furent ensuite injectées dans la veine porte de macaques de 2-3 kg. A 6 semaines, aucune expression d'AAVsb n'était détectable, tandis qu'une expression 20 à 35 fois supérieure était obtenue avec les AAVsc. Un an après l'injection, des analyses par qPCR ont détecté un nombre de copies virales de l'ordre de 2 à 3-log supérieures dans le foie, par rapport aux autres tissus (Gao *et al.*, 2006).

L'inconvénient majeur des AAVsc est leur capacité maximale d'encapsidation, qui est réduite de moitié par rapport aux AAVsb classiques, soit environ 2.4 kb. Il a été cependant montré qu'il était possible d'encapsider jusqu'à 3.3 kb (Wu *et al.*, 2007)

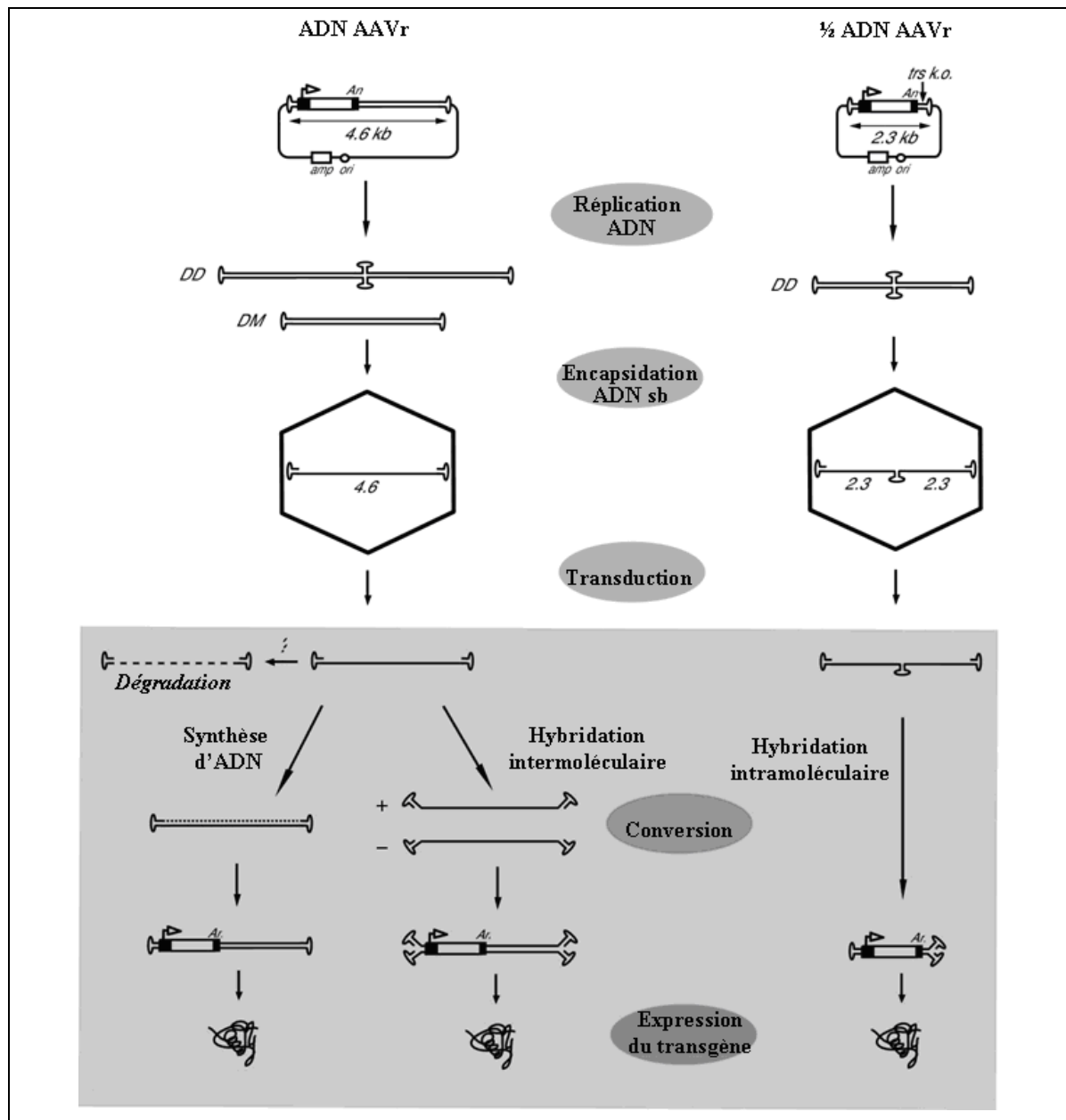


Figure 15. Comparaison entre AAV sb et AAVsc (d'après Gonçalves et al., 2005) A gauche : la répllication de l'ADN des AAV simple brin permet la formation d'intermédiaires répllicatifs sous forme de duplexes monomériques (DM) et de duplexes dimériques (DD). Ces composés sont ensuite encapsidés. Après transduction de la cellule-cible, les génomes simple brin sont convertis en double brin, soit par synthèse du second brin, soit par hybridation intermoléculaire. A droite : Le génome des AAVsc est composé de la moitié du génome AAV simple brin classique. La présence d'une séquence *trs* (terminal resolution site) mutée permet la formation de duplexes dimériques comportant une ITR mutée au centre de leur structure, en plus des 2 ITR classiques à chaque extrémité. Après encapsidation des AAVsb, et leur transduction de la cellule cible, une hybridation intra-moléculaire conduit à une formation rapide et autonome des structures double brin, d'où une expression plus rapide du transgène.

VII. Risques de réaction immunitaire contre les vecteurs AAV

La réponse immunitaire contre l'AAVr peut être dirigée soit contre le produit du transgène, soit contre la capsid virale elle-même. Dans les deux cas, la conséquence peut être une perte totale d'expression du vecteur. Il semble donc nécessaire de comprendre les mécanismes mettant en jeu cette réaction immunitaire, avant de développer toute stratégie thérapeutique avec ce type de vecteurs. C'est encore plus important pour les protocoles ciblant le foie, à cause des fonctions immunitaires de cet organe.

1. Contre le produit du transgène

Une réponse immune dirigée contre le produit du transgène peut être observée après l'injection de vecteurs AAV. Ceci est dû principalement à l'activation des lymphocytes T par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), qui vont exprimer à leur surface des épitopes de la protéine néo-synthétisée. Deux voies de présentations par les CPA sont possibles (Zaiss *et al.*, 2008) :

Dans certaines pathologies, les mutations génétiques induisent la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle ou l'absence complète de protéine. Le produit du transgène peut donc être reconnu comme exogène. Il peut être endocyté ou phagocyté, puis présenté à la surface de cellules présentatrices d'antigène. Ceci conduit à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, et des CD8⁺ par le CMH de classe I. Lorsque la mutation impliquée n'induit qu'un changement minime de la structure protéique, alors l'enzyme synthétisée à partir du transgène peut être considérée comme faisant partie du soi. Dans ce cas, aucune réponse immune n'est observée.

Les principaux critères induisant le déclenchement d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène sont l'abondance, la cinétique d'expression et l'immunogénicité de la protéine néo-synthétisée. C'est un phénomène souvent dose-dépendant, rapidement contrôlé en adaptant les doses administrées au patient, ou bien en utilisant un promoteur et/ou un sérotype plus adapté au tissu ciblé (Zaiss *et al.*, 2008).

2. Contre la capside virale

Entre 50 et 96% de la population mondiale est séropositive pour l'AAV 2 (Moskalenko *et al.*, 2000 ; Erles *et al.*, 1999). Chez les personnes positives, on estime à environ 18-67.5% le taux d'anticorps neutralisants. D'autres études avancent le chiffre de 20% d'anticorps neutralisants dirigés contre l'AAV2, et 3.8% celui contre l'AAV8 (Zaiss *et al.*, 2008). Chaque sérotype d'AAV possède des protéines spécifiques à la surface de sa capside, ce qui lui permet une plus grande affinité pour un ou plusieurs types cellulaires donnés. Cependant, l'administration répétée d'un vecteur peut engendrer une réponse immune par des anticorps neutralisants, même s'ils n'étaient pas présents avant. Cette réponse immunitaire est due à l'existence de cellules T mémoires CD8+, spécialistes de la capside. Des études *in vitro* ont montré qu'elles pouvaient être réactivées lors d'une seconde infection (Mingozzi *et al.*, 2007).

Différentes stratégies sont envisageables pour pallier ce problème. Tout d'abord, il est possible d'utiliser des AAV de deux sérotypes différents. Ceci est uniquement possible si ces sérotypes ont le même tropisme, comme les AAV 6 et 8, pour le foie (Scallan *et al.*, 2006). On peut également muter les épitopes de la capside qui sont reconnus par ces anticorps neutralisants. Dans ce cas, il faut veiller à ce que différents paramètres, tels que le site de liaison au récepteur cellulaire, l'entrée dans la cellule, etc., ne soient pas altérés.

Lors d'un essai clinique avec des AAV-2 codant le facteur IX déficient dans l'hémophilie B, une réponse T cytotoxique dirigée contre la capside fut observée chez un patient, tandis que rien ne fut observé sur un second patient, à la même dose. En outre, un troisième patient, ayant reçu une dose plus faible, présenta lui aussi des signes de réponse immunitaire (Manno *et al.*, 2006). Ce phénomène de réponse immune contre les vecteurs AAV est donc patient-dépendante, et doit être étudiée au cas par cas. Les malades ayant réagit positivement avaient du être infectés au préalable par des AAV-2, dans l'enfance par exemple, ce qui avait activé des cellules T mémoires spécifiques. Lors de l'administration du vecteur, ces cellules ont été réactivées, conduisant au déclenchement d'une réaction immunitaire. Les modèles animaux utilisés lors des essais précliniques n'avaient pas été primo-infectés par des AAV sauvages, ce qui explique l'absence de réponse immune après

l'injection des vecteurs. Il semblait donc difficile de prévoir ce type de phénomène chez l'Homme (Büning *et al.*, 2008).

L'équipe du Pr. High construisit un récepteur soluble TCR à partir d'un clone CD8⁺ spécifique de la capside de l'AAV2, afin de mettre en évidence la présence *in vitro* de complexes liant des molécules CMH de classe II à des protéines de capside virale. L'analyse des cultures d'hépatocytes révéla la présence d'anticorps dirigés contre la capside virale, induisant la lyse spécifique des cellules transduites. Les auteurs montrèrent un rôle bénéfique des multimères TCR, à savoir l'inhibition de la lyse des cellules transduites. Il pourrait être intéressant d'utiliser cet avantage dans de futurs essais de thérapie génique, afin de palier les risques de réponse immunitaire induits par les vecteurs AAVr (Pien *et al.*, 2009).

VIII. Principaux protocoles de thérapie génique utilisant des AAVr

Les premiers essais cliniques utilisant des vecteurs AAV ont été réalisés pour le traitement de la mucoviscidose et de l'hémophilie B (Mueller et Flotte, 2008). Il s'agissait d'AAV recombinants de sérotype 2. A l'heure actuelle, de nombreux protocoles cliniques sont en cours avec des AAV de sérotypes variés, pour le traitement de nombreuses pathologies.

1. Mucoviscidose

Des vecteurs AAV-2 codant le gène *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ont été administrés à des lapins de Nouvelle-Zélande, modèle animal de cette pathologie, par instillation endobronchique. Ceci a permis une persistance du transgène pendant 6 mois. Des résultats encourageants ont également été obtenus chez le primate non-humain, ce qui a permis la mise en place d'un essai clinique de phase 1 entre 1996 et 2003. Dans cette étude, 25 patients reçurent des AAV2r porteurs du gène *CFTR* humain. Ces vecteurs furent injectés par voie intranasale et endobronchiale, à des doses comprises entre 6×10^4 et 2×10^{12} pv. Malheureusement, les essais furent rapidement stoppés en raison d'un effet limité du transgène et d'une réponse immune dirigée contre la capside virale (Flotte *et al.*, 2003).

2. Hémophilie B

Des vecteurs AAV2 portant le gène du facteur IX de coagulation ont été injectés dans des modèles de lapin et de chien, avec une grande efficacité (Kay *et al.*, 2000 ; Manno *et al.*, 2003), ce qui conduit au développement d'essais cliniques de phase 1. L'injection d'AAV2r à 8×10^{10} ou 4×10^{11} pv/kg n'eut aucun effet thérapeutique, et n'induisit aucune toxicité. Par contre, une augmentation significative de facteur IX fut obtenue à la dose de 2×10^{12} pv/kg. Toutefois, cet effet ne fut que transitoire, limité à environ 8 semaines. Il fut corrélé à une élévation des transaminases hépatiques et à une destruction progressive des hépatocytes transduits (Manno *et al.*, 2006).

Dans ces deux types d'essais (mucoviscidose et hémophilie B), l'efficacité des AAV recombinants s'est avérée transitoire. Ceci semble dû, au moins en partie, au déclenchement d'une réponse cytotoxique dirigée contre ces vecteurs. Une amélioration possible des protocoles consiste à cibler les cellules ou le tissu-cible, grâce à l'utilisation de différents promoteurs ou de sérotypes ayant un tropisme plus spécifique.

Des études plus récentes, toujours avec l'AAV de sérotype 2, ont permis la correction à plus ou moins long terme d'autres maladies ciblant divers organes tels que la rétine, le système nerveux central ou le muscle, démontrant ainsi le large champ d'action des vecteurs AAV.

3. Pathologies rétinienne

L'amaurose congénitale de Leber est une maladie génétique grave de la rétine, conduisant à une cécité ou un défaut majeur de la vision dès le plus jeune âge. Dans 15% des cas, la dégénérescence rétinienne est due à des mutations dans le gène RPE65 (Retinal Pigment Epithelium). Des études pré-cliniques ont été réalisées chez le chien Briard (RPE -/-). Des vecteurs AAV2/4 portant l'ADNc de gène RPE65 humain sous contrôle du promoteur RPE65 humain furent injectés dans la rétine de chiens âgés de 8 à 11 mois. Ceci permit une restauration complète de la vision, observable dès J15 puis maximale à 3 mois, et stable à long terme. Par contre, l'injection d'un animal âgé de 30 mois n'eut aucun effet

thérapeutique, surement dû à l'état trop avancé de la pathologie (Rolling *et al.*, 2006 ; Le Meur *et al.*, 2007). Actuellement, 3 essais cliniques de phase I utilisant des vecteurs AAV sont en cours (<http://clinicaltrials.gov>). Les résultats récents d'une de ces études font part d'une amélioration significative des capacités rétinienne à 2 ans post injection chez 12 patients âgés de 8 à 44 ans. Les niveaux de correction sont variables en fonction du degré de dégénérescence rétinienne, et de l'âge des patients traités. La plus nette amélioration est observée chez les enfants, âgés de 8 à 11 ans au moment de l'injection (Maguire *et al.*, 2009).

4. Atteintes du système nerveux central

La première pathologie nerveuse traitée par les vecteurs AAV était le déficit en aspartoacétylase (ASPA), ou maladie de Canavan. Lors d'un essai clinique de phase 1, dix malades furent injectés par des AAV recombinants codant l'ASPA humaine, à une dose de 3.8×10^{11} (n=3) ou 7.1×10^{12} vg (n=7), dans le parenchyme cérébral. Des anticorps neutralisants furent détectés dans le sérum avant et après l'injection, à de faibles concentrations chez 2 patients du premier groupe, et à de très fortes doses chez un patient du second groupe. Toutefois, ces anticorps n'ont été détectés que dans la circulation sanguine, mais pas dans le liquide cérébro-spinal. De plus, il n'y avait aucun signe d'inflammation, ce qui a permis la poursuite de l'essai (McPhee *et al.*, 2006).

Des tests encourageants chez le modèle animal de la maladie de Parkinson (Kordower *et al.*, 2006 ; Gasmi *et al.*, 2007) ont permis la mise en place d'un essai clinique de phase I avec des AAV-2 portant le gène de la Neurturine (NTN). Ces vecteurs, nommés CERE-120, ont conduit à une amélioration du score parkinsonien chez les patients, à 1 an post traitement (Marks *et al.*, 2008). Toutefois, aucun résultat significatif ne fut observé lors de l'essai clinique de phase II réalisé sur 58 patients, ce qui conduit à l'arrêt de cette étude (<http://www.ceregene.com>).

Un test de phase II est actuellement en cours. Des essais cliniques se poursuivent également dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, grâce à des vecteurs CERE-110 codant le gène du facteur de croissance NGF (Nerve growth factor) (<http://clinicaltrials.gov/>).

Dans certains organes immuno-privilégiés tels que le cerveau et la rétine, l'injection d'AAVr semble donc relativement efficace à long terme. Dans d'autres organes comme le foie ou le muscle, les résultats ne sont pas aussi évidents. Les AAVr permettent parfois une expression stable du transgène, mais il n'est pas encore clairement établi si cela est dû à un phénomène de tolérance, ou bien d'ignorance. Dans d'autres cas, une réaction immunitaire a peut être observée. Il est alors nécessaire de mettre en place des stratégies afin de moduler et/ou de supprimer cette réponse.

OBJECTIFS DE LA THESE

J'ai réalisé ma thèse dans le laboratoire de Biothérapies Hépatiques de Nantes (INSERM U948), dirigé par le Dr. Ferry. L'un des axes de recherche de cette unité est le développement de stratégies de thérapie génique pour le traitement des maladies métaboliques héréditaires. Nous étudions plus précisément la maladie de Crigler-Najjar de type 1, du fait de ses caractéristiques de maladie modèle.

Différentes approches expérimentales utilisant des vecteurs viraux ont été testées au laboratoire chez le rat Gunn, modèle animal de maladie de Crigler-Najjar de type 1. L'injection de vecteurs rétroviraux portant l'ADNc de l'UGT1A1 humaine chez le rat Gunn adultes ne permit qu'une correction transitoire de l'hyperbilirubinémie, due au déclenchement d'une réponse cytotoxique (Aubert *al.*, 2002). Cette réaction immunitaire fut évitée lors de l'injection de rats Gunn nouveau-nés, guéris à long terme par une seule injection rétrovirale (Bellodi-Privato *et al.*, 2005 ; Nguyen *et al.*, 2007). Des vecteurs lentiviraux furent également testés, et permirent également la correction à long terme de la pathologie, après administration à des rats Gunn âgés de 2 jours (Nguyen *et al.*, 2005). Plus récemment, de nouvelles approches chirurgicales ont été développées afin de permettre une utilisation efficace de ce type de vecteurs chez le rat Gunn adulte. Le contrôle de la réponse immunitaire contre le produit du transgène doit encore être résolue (Dariel *et al.*, 2009).

Ma thèse s'inscrit dans la lignée de toutes les études précédentes, et a consisté en une mise au point d'un protocole utilisant les vecteurs AAV chez le rat Gunn jeune ou adulte. Cette étude fut réalisée selon trois axes :

- Tout d'abord, des AAVr codant l'UGT1A1 humaine furent injectés à des rats Gunn âgés de 2 ou 14 jours. La diminution potentielle de l'hyperbilirubinémie fut ensuite mesurée par différents critères, tels que des dosages enzymatiques et des qPCR. En parallèle, d'autres rats âgés de 2 jours reçurent des vecteurs AAVr portant le gène rapporteur LacZ. Ceci nous permit de déterminer plus précisément le comportement des vecteurs AAV à long terme dans le foie d'un très jeune animal. Cette étude mis en évidence la présence de phénomènes intégratifs au niveau de certains hépatocytes.

- Le maintien des vecteurs AAV sous une forme intégrée fut considéré avec attention, car des études récentes ont montré que cela pouvait conduire à la formation de tumeurs hépatiques (Donsante *et al.*, 2008). Dans notre protocole, un agent promoteur de tumeurs chez le rat, le 2-acétylaminofluorène (2-AAF), fut utilisé en complément d'une injection d'AAVr à J2, afin d'amplifier les cellules potentiellement transformées par l'intégration du vecteur.

- Enfin, un protocole fut également mis en place afin de tester l'efficacité de nos AAVr chez le rat Gunn adulte. Une étude réalisée par l'équipe du Pr. Bosma a déjà montré une diminution à long terme de l'hyperbilirubinémie grâce à ce type de vecteurs. Cependant, cette correction n'était que partielle (Seppen *et al.*, 2006). Ces résultats peuvent donc être améliorés, notamment grâce à l'utilisation de nouveaux vecteurs, les AAVsc, qui ont montré des résultats très prometteurs chez l'animal (Fu *et al.*, 2003 ; Gao *et al.*, 2006). Différentes voies d'injection ainsi que différents promoteurs furent testés dans notre laboratoire, afin de déterminer la meilleure stratégie possible pour une correction à long terme de la pathologie à l'aide d'AAVsc.

Toutes ces études ont pour but la mise au point d'un protocole de thérapie génique applicable et efficace chez l'Homme. Différents points essentiels seront donc établis, à savoir : le type d'AAV optimal, son sérotype, et la voie d'injection à utiliser. Les risques de réponse immune ou de carcinogenèse seront également contrôlés avec précision.

PARTIE 2 - RÉSULTATS : THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR DE TYPE 1 PAR DES AAV RECOMBINANTS

Chapitre 1 : Expression des vecteurs AAV chez le jeune rat

I. Introduction

Des études ont montré que l'injection d'AAVr chez des animaux adultes entraîne l'expression à long terme du transgène dans de nombreux tissus dont le foie. Ainsi, des AAV de sérotype 2 codant le facteur IX humain ont permis la correction à long terme de l'hémophilie B dans des modèles murin et canin (Snyder et al., 1997 ; Snyder et al., 1999 ; Mount et al., 2002). Ces expérimentations ont montré la faisabilité de correction d'une maladie hépatique grâce à des vecteurs de type AAV. Cependant, la sévérité de certaines pathologies peut nécessiter un traitement précoce du malade. Ceci est valable dans le cas de maladies très graves telles que la maladie de Crigler-Najjar de type 1. C'est aussi le cas pour des pathologies entraînant des lésions progressives du foie, comme de la fibrose par exemple, car ceci peut potentiellement empêcher l'accès des vecteurs de transfert de gène aux hépatocytes.

Des études antérieures chez la souris nouveau-née ont permis une correction à long terme de la mucopolysaccharidose de type VII ou de la glycogénose de type Ia (Daly et al., 2001 ; Sun et al., 2002 ; Ghosh et al., 2006). Cependant, d'autres études ont conduit à une perte progressive de l'expression du transgène dans le foie, tandis qu'une persistance à long terme était observée dans le muscle (Wang et al., 2005 ; Kugler et al., 2007 ; Tessitore et al., 2008).

Une diminution significative et stable de l'hyperbilirubinémie a déjà été obtenue avec des vecteurs AAV chez le rat Gunn adulte (Seppen et al., 2006). Dans cette étude, des rats Gunn mâles de 6-8 semaines ont été injectés par des AAVr codant le gène de l'UGT1A1 sous contrôle du promoteur ubiquiste du cytomégalo virus (CMV). Ces vecteurs contenaient également la séquence WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional

regulatory element), qui permet la régulation post-transcriptionnelle du transgène, et donc une meilleure expression des vecteurs (Loeb et al., 1999).

Ces AAVr, de sérotype 1, 2, 6 ou 8, furent administrés par voie intraportale à une dose comprise entre 2.5 et 5×10^{12} pv/kg. Les auteurs observèrent une diminution du taux de bilirubine sérique avec tous les vecteurs. Les moins efficaces étaient les AAVr de sérotype 2 et 6, car ils permirent une correction significative jusqu'à 26 et 54 semaines post injection, respectivement. Les vecteurs les plus efficaces étaient les AAVr de sérotype 1 et 8, induisant une diminution significative de l'hyperbilirubinémie pendant plus de 82 semaines. Des anticorps anti-UGT1A1 furent détectés dans le sérum de tous les animaux, mais ne semblèrent pas avoir d'effet évident sur la correction à long terme. Ce développement d'anticorps put être évité grâce à l'utilisation du promoteur hépatos spécifique albumine. Cependant, dans ce cas la correction de l'hyperbilirubinémie était plus faible que celle observée avec le promoteur ubiquiste CMV (Seppen et al., 2006).

Nous avons donc voulu tester si cette guérison était également possible chez le jeune animal. Des AAVr codant l'UGT1A1 humaine ont été injectés à de jeunes rats Gunn afin d'étudier la cinétique d'expression de ces vecteurs. Des AAVr portant le gène rapporteur LacZ ont ensuite été utilisés pour permettre une quantification plus précise du niveau de transduction. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication, en annexe 2 (Flageul et al., 2009).

II. Injection de vecteurs codant l'UGT1A1

Deux cohortes de rats Gunn homozygotes (-/-) ont reçu des AAV 2/8 CMV UGT1A1 à une dose de 1×10^{13} pv/kg. Ces vecteurs ont été injectés en veine temporale à J2 (groupe 1, n = 4) ou en veine porte à J14 (groupe 2, n = 6).

1. Dosage de la bilirubine dans le sérum

Les animaux ont été prélevés régulièrement afin de quantifier le taux de bilirubine dans le sérum. Une cohorte d'animaux homozygotes non injectés a également été suivie comme groupe contrôle (Figure 16).

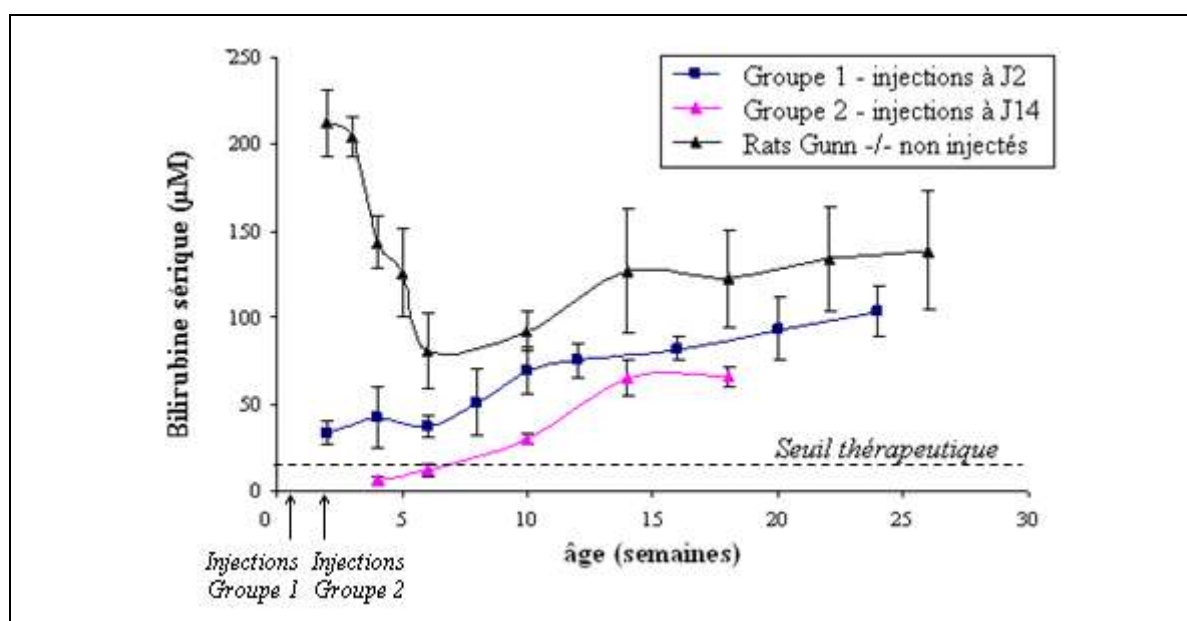


Figure 16. Suivi de la bilirubinémie dans le sérum de rats Gunn injectés à 2 ou 14 jours avec des vecteurs AAV 2/8 CMV UGT1A1. Les vecteurs ont été injectés en veine temporale à J2 (groupe 1) ou en veine porte à J14 (groupe 2), à une dose de 1×10^{13} pv/kg. On observe une correction partielle (groupe 1) ou totale (groupe 2) de l'hyperbilirubinémie, mais transitoire. Toutefois, une correction résiduelle persiste à long terme dans les 2 cohortes injectées.

Dans les deux groupes d'animaux injectés, les premiers prélèvements montrent des taux de bilirubine sériques très inférieurs à ceux des contrôles. Il y a donc eu correction de l'hyperbilirubinémie, ce qui révèle une activité enzymatique UGT1A1 efficace. Dans le groupe 1, le taux de bilirubine à l'âge de 2 semaines est de 33.5 ± 6.4 µM, contre 212.4 ± 19.3 chez les animaux contrôles ($p < 0.001$). Dans le groupe 2, le taux de bilirubine est à 6.3 ± 1.8 uM à l'âge de 4 semaines, soit à 2 semaines post injection. Cette valeur est inférieure à 10 µM, correspondant au seuil thérapeutique. Elle est significativement différente du taux mesuré chez les animaux du groupe 1 (42.3 ± 17.2 ; $p = 0.025$) ou non injectés (143.8 ± 15.0 µM ; $p < 0.001$). Par la suite, la concentration de bilirubine sérique remonte rapidement dans les 2 groupes injectés, mais cependant les animaux restent partiellement corrigés à long terme. A 24 semaines, le niveau de bilirubine sérique du groupe 1 est de 103.3 ± 14.0 µM ($p < 0.03$ par rapport aux contrôles âgés de 22 ou 26 semaines). A 18 semaines, les animaux du groupe 2 ont un taux de bilirubine toujours significativement inférieur au groupe contrôle (42.3 ± 17.2 µM contre 122.9 ± 30.3 µM ; $p < 0.001$).

2. PCR quantitatives sur foie total

Des analyses par PCR quantitative (qPCR) ont été effectuées au sacrifice afin de quantifier le nombre de copies du transgène à long terme dans le foie. Elles ont été réalisées à l'âge de 24 semaines pour les rats du groupe 1, et à 18 semaines pour ceux du groupe 2. On mesure 0.35 ± 0.26 copies par génome diploïde dans le groupe injecté à J2, et 2.58 ± 0.71 copies dans le groupe injecté à J14. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de bilirubinémie dans le sérum, plus faibles dans la cohorte des rats ayant reçu les AAVr à l'âge de 2 semaines.

3. Immunohistochimie

Des échantillons de foie ont été prélevés au sacrifice puis fixés dans de la formaline et inclus en paraffine. Des coupes de 5 μ m ont ensuite été colorées en hémalun et phloxine afin de révéler la structure hépatique. Les résultats montrent une histologie normale, sans aucun signe d'inflammation (Figure 17).

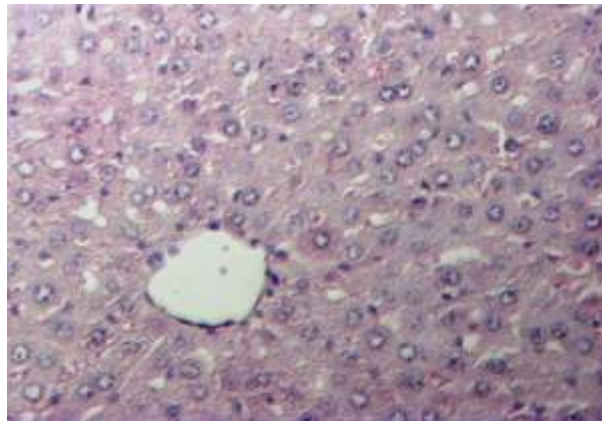


Figure 17. Coloration hémalun / phloxine sur du foie de rats injectés à J2 ou J14 par des vecteurs AAV 2/8 CMV UGT1A1. Des coupes histologiques de foie ont été réalisées au sacrifice, soit à 24 semaines pour le groupe injecté à J2, ou à 18 semaines pour les animaux injectés à J14. Aucune lésion histologique du foie n'a été observée.

Coupes en paraffine de 5 μ m ; grossissement x10

Une diminution significative du taux de bilirubine totale dans le sérum a pu être observée après injection des vecteurs AAV. Ceci témoigne d'une activité enzymatique UGT1A1 humaine fonctionnelle, permettant une conjugaison efficace de la bilirubine. Les faibles niveaux de bilirubine sérique dans les premières semaines suivant l'injection semblent indiquer un nombre élevé de cellules transduites. Par la suite, la bilirubinémie augmente, ce qui pourrait être dû à une perte d'expression de l'enzyme, causée par la dilution du transgène au cours des divisions du foie jeune. Le maintien d'une correction résiduelle à long terme pourrait être lié à une expression à long terme de l'UGT1A1 au niveau de certains hépatocytes, restant transduits à long terme. A l'heure actuelle, nous ne disposons pas d'outils permettant de détecter les cellules exprimant l'UGT1A1 par immunohistochimie ou toute autre technique de marquage *in situ*. Nous avons donc choisi de poursuivre notre étude avec des AAVr contenant le gène LacZ qui code la β -galactosidase d'*Escherichia Coli*. En effet, les techniques de marquage histologiques et les outils classiques de biologie moléculaire (qPCR, southern blot) sont disponibles pour ce transgène, ce qui devrait nous permettre de vérifier notre hypothèse.

III. Injection de vecteurs codant la β -galactosidase d'*Escherichia Coli*

Afin de permettre une évaluation quantitative de l'efficacité de transduction des AAV chez le jeune animal, des AAVr 2/8 CMV *nls* LacZ ont été injectés à des rats Gunn hétérozygotes (+/-) ou Wistar âgés de 2 jours. Ces vecteurs ont été administrés en veine temporale, à une dose de $1.4 - 2 \times 10^{13}$ pv/kg. Ce transgène a été choisi car contrairement à l'UGT1A1, une détection directe de l'activité β -galactosidase est possible *in situ* par coloration Xgal et immunohistochimie.

1. Etude sur foie total

1.1. Coloration Xgal et immunohistochimie

Les animaux ont été sacrifiés à 7 jours (n = 10), 1 mois (n = 34) ou 3 mois (n = 34) post injection. Après fixation dans la formaline, le foie est déposé dans une solution de Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), qui permet une détection

directe de l'activité enzymatique en colorant les cellules positives en bleu. Des coupes histologiques en paraffine ont ensuite été réalisées afin de quantifier plus précisément cette expression (Figure 17).

La proportion de rats positifs en Xgal à 7 jours est de 100 % (10/10). Elle diminue à 65 % (22/34) dans le groupe des rats sacrifiés à 1 mois, puis à 32 % (11/34) chez ceux sacrifiés à 3 mois. Nous avons voulu déterminer si la perte d'expression du transgène chez certains animaux pouvait être due à une réponse immunitaire. Chez le rat, nous ne disposons pas de test ELISpot spécifique de la β -galactosidase. Il ne nous est donc pas possible de quantifier directement une éventuelle réponse lymphocytaire T. Par contre, un test ELISA est disponible, permettant de mettre en évidence la présence ou non d'anticorps dirigés contre la protéine β -galactosidase. Lors d'études précédentes, une bonne corrélation avait été établie entre la présence d'anticorps anti- β -galactosidase et le déclenchement d'une réponse cytotoxique dirigée contre la protéine (Aubert et al., 2002).

Nous avons donc effectué des tests ELISA sur les animaux négatifs en Xgal à 3 mois ($n = 10$) afin de détecter la présence ou non d'anticorps dirigés contre la β -galactosidase. Deux groupes de rats, positifs en Xgal à 3 mois ($n = 4$) ou non injectés ($n = 2$), ont servi de contrôles (Figure 18). On observe une nette présence d'anticorps dans le sérum des animaux négatifs en Xgal, et aucun anticorps chez tous les rats exprimant la protéine à long terme.

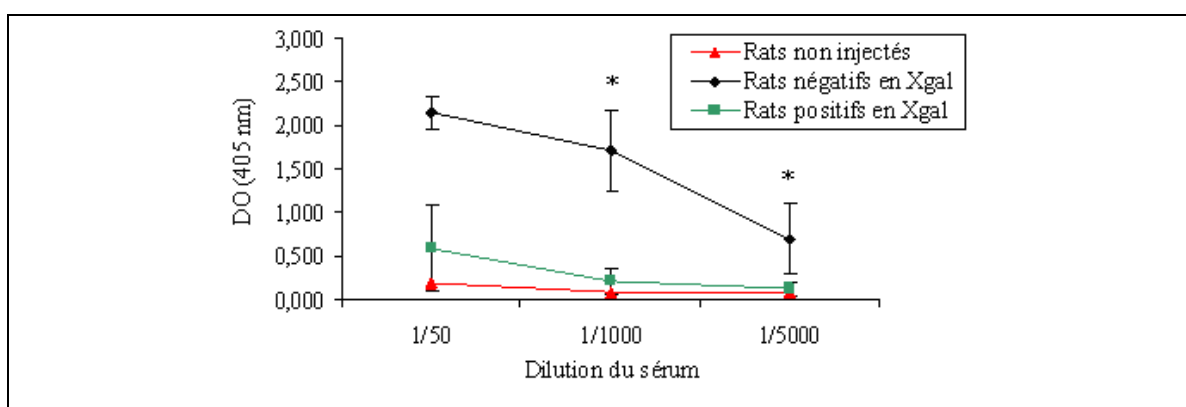


Figure 18. Détection d'anticorps anti- β -galactosidase par test ELISA. La présence d'anticorps dirigés contre la protéine β -galactosidase a été évaluée dans le sérum des rats injectés à J2 pr des vecteurs AAV2/8 CMV *nls* LacZ. Tous les rats négatifs en coloration Xgal ont des anticorps dans le sérum, tandis qu'aucun des rats positifs en Xgal n'a développé d'anticorps anti- β -galactosidase (* $p < 0.01$).

A 7 jours post injection, le nombre de cellules transduites détectées par immunohistochimie est d'environ 25 %. A 1 mois, il est inférieur à 1%, ce qui correspond à une diminution d'environ 35 fois. Cela semble principalement dû à une dilution des génomes AAV au cours de la croissance du foie. A 3 mois, le pourcentage de cellules positives n'est plus que de 0.14 %, soit une diminution de 5 fois par rapport à la valeur d'1 mois, et de 180 fois par rapport à J7 (Figure 19 et tableau 5).

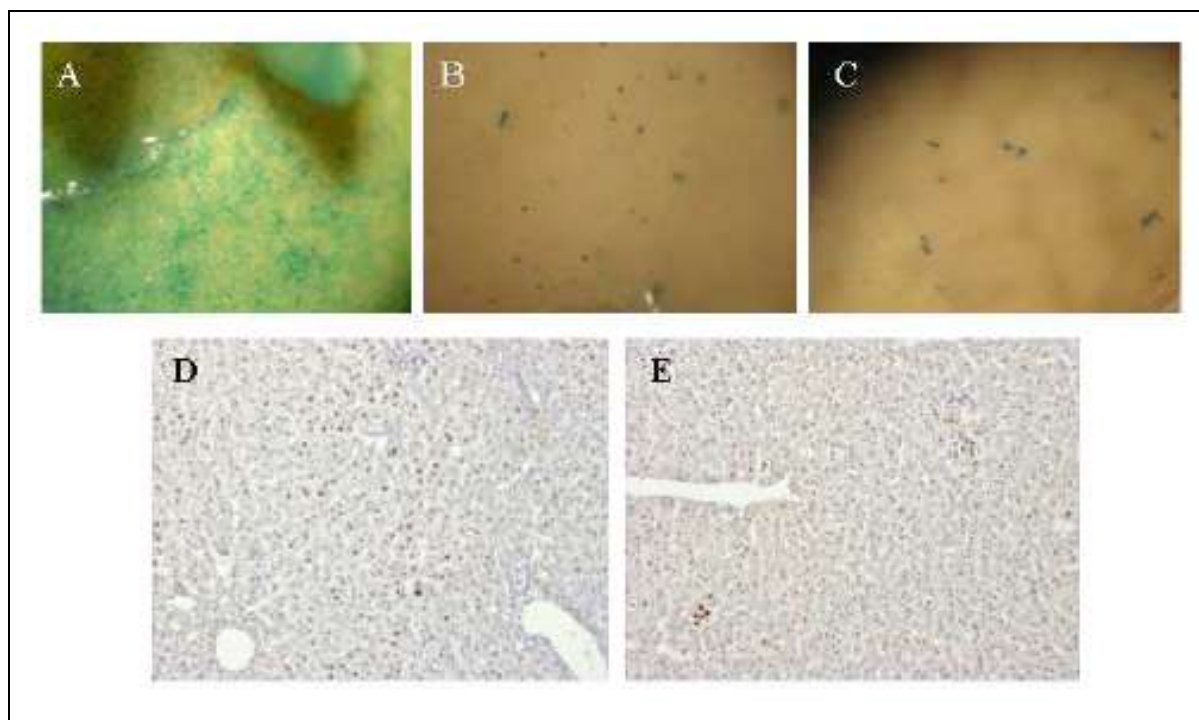


Figure 19. *Détection de l'activité β -galactosidase par coloration Xgal et immunohistochimie.* Des échantillons de foies de rats injectés à J2 par des vecteurs AAV2/8 CMV nls LacZ ont été colorés en Xgal à 7 jours (A), 1 mois (B), ou 3 mois (C). Des marquages par immunohistochimie sur des coupes en paraffine ont été également réalisés à 7 jours (D), 1 mois, ou 3 mois (E). Des cellules positives sont observées dès 7 jours post injection, et persistent à long terme sous forme d'amas.

A, B et C : observations sous loupe binoculaire ; D et E : coupes en paraffine de 5 μ m ; grossissement x10 pour chaque photographie.

1.2. Mesure de l'efficacité de transduction dans le foie

L'efficacité de transduction dans le foie a été déterminée par des dosages d'activité β -galactosidase et des PCR quantitatives au sacrifice (Tableau 5). A 7 jours post injection, l'activité enzymatique est élevée, et on mesure un nombre important de copies du

transgène par génome diploïde. L'activité enzymatique diminue ensuite de 58 fois à 1 mois, et de 2.5 fois à 3 mois. Cela équivaut à une baisse de 146 fois entre J7 et 1 mois. Le nombre de copies d'AAVr par cellule diminue également, de 6 fois à 1 mois et de 4 fois à 3 mois. Cela correspond à une diminution de 28 fois entre J7 et 3 mois. La baisse du nombre de copies par qPCR signifie que cette diminution d'expression n'est pas due à une extinction du promoteur CMV. Dans les trois groupes d'animaux, nous avons mesuré une bonne corrélation entre le pourcentage de cellules positives en histologie, la mesure de l'activité enzymatique, et le nombre de copies du transgène ($r^2 = 0.97$).

Tableau 5. Efficacité de transduction dans le foie à 7 jours, 1 mois et 3 mois post injection

Groupe	Cellules positives en β -galactosidase (%)	Activité β -galactosidase (ng/mg protéines totales)	Nombre de copies LacZ par génome diploïde
7 jours (n = 10)	22.00 (18.38 ; 28.75) (12.00 – 50.00)*	67.43 (50.83 ; 90.18) (50.12 – 537.31)*	13.79 (5.83 ; 22.85) (5.33 – 76.48)*
1 mois (n = 22)	0.37 (0.16 ; 1.15) (<0.10 – 2.40)*	1.66 (0.62 ; 3.41) (0.16 – 8.34)*	2.92 (1.06 ; 5.31) (0.06 – 9.83)*
3 mois (n = 11)	0.10 (0.08 ; 0.20) (<0.10 – 0.37)*	0.71 (0.22 ; 1.41) (0.03 – 2.54)*	0.71 (0.31 ; 0.97) (0.18 – 2.28)*

Les valeurs sont indiquées sous forme de médiane (quartile 1 ; quartile 3)

* valeurs minimale et maximale pour chaque groupe

1.3. Southern blot

Des hybridations par southern blot ont été réalisées afin de détecter les formes moléculaires de l'AAV présentes dans le foie. Cette technique consiste à marquer spécifiquement de l'ADN génomique transféré sur une membrane de nylon. L'ADN est préalablement digéré par des enzymes de digestion permettant de différencier les formes AAV. Dans notre étude, la digestion du foie par EcoNI, qui n'a aucun site de restriction dans la séquence du vecteur, permet de mettre en évidence les formes monomériques et concatémériques. La digestion avec HindIII, qui possède un site de restriction dans la séquence AAV, permet de discriminer les formes multimériques où les génomes AAV sont en position « head-to-tail » et « tail-to-tail ».

Les membranes de southern blot sont présentées dans la figure 20. A 7 jours post injection, la plupart des AAV sont des concatémères, avec également la présence de quelques monomères. La majorité de ces formes AAV sont en conformation « head-to-tail ». A un mois, on observe une diminution de tous les types de structures, puis à 3 mois aucune forme n'est plus détectable par cette technique.

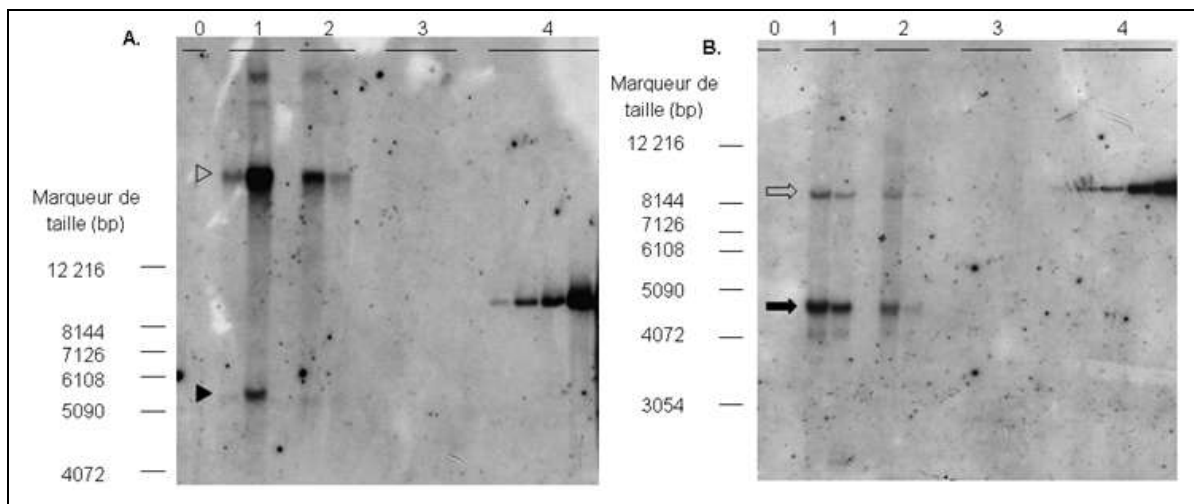


Figure 20. Analyse par Southern blot sur le foie total. Dix microgrammes d'ADN génomique total ont été digérés par EcoNI (A ; 0 site de restriction) ou HindIII (B ; 1 site de restriction), séparés sur gel d'agarose, puis transférés sur une membrane de nylon. Une hybridation par une sonde spécifique marquée, consistant en un fragment du plasmide AAV amplifié par PCR, a ensuite été réalisée afin de détecter la présence des différentes conformations génomiques des vecteurs AAV.

La ligne 0 est le contrôle négatif, un rat non injecté. Les pistes 1, 2 et 3 correspondent à des animaux injectés à J2 par les AAVr 2/8 CMV nls LacZ, et sacrifiés à J7 ($n = 2$), 1 mois ($n = 2$) ou 3 mois ($n = 3$), respectivement. La piste 4 représente la gamme de copies plasmidiques, de 0.1 à 5 copies par génome diploïde pour la digestion EcoNI, et de 0.1 à 10 copies pour la digestion HindIII.

Les triangles blancs et noirs désignent les concatémères et les monomères, tandis que les flèches blanches et noires montrent les structures « tail-to-tail » et « head-to-tail ».

2. Etude des zones exprimant ou non la β -galactosidase

2.1. Dissection de zones positives ou négatives en Xgal

Afin d'étudier plus précisément les cellules exprimant le transgène à long terme, des clusters de cellules positives ont été macrodisséqués sous loupe binoculaire à 1 mois et 3 mois post injection (Figure 21). Des zones négatives ont également été récupérées afin de servir de contrôles.

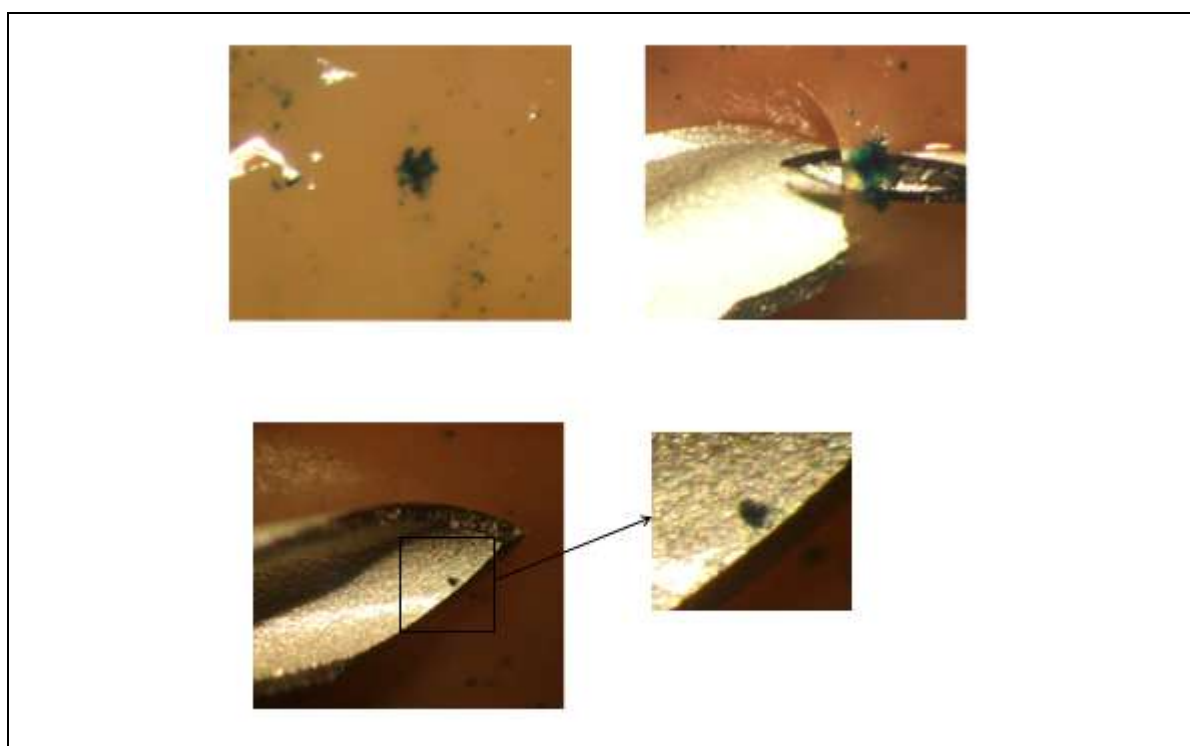


Figure 21. Macrodissection d'une zone positive à 3 mois. Les photos représentent les principales étapes permettant la récupération d'un clone de cellules exprimant la β -galactosidase sous loupe binoculaire

L'ADN génomique de ces échantillons a ensuite été extrait. Seuls les échantillons ayant une concentration d'ADN génomique supérieure à 20 ng/ μ l ont été gardés pour une analyse ultérieure par qPCR (Tableau 6).

Tableau 6. Echantillons macrodisséqués sous loupe binoculaire et inclus dans l'analyse par qPCR

Type d'échantillon	Nombre de rats étudiés	Nombre total d'échantillons
Zones positives (1 mois)	n = 5	n = 19
Zones positives (3 mois)	n = 4	n = 32
Zones négatives (3 mois)	n = 2	n = 17

2.2. PCR quantitatives

On observe des nombres très élevés de copies du gène LacZ dans les clones positifs, jusqu'à plus de 500 exemplaires par génome diploïde. Les résultats obtenus ne sont significativement pas différents entre les clones disséqués à 1 et 3 mois ($p = 0.44$). Ils sont par contre 75 fois supérieurs à la quantité détectée dans les zones négatives ($p < 0.001$). Les valeurs de qPCR dans les échantillons négatifs semblent correspondre à des génomes AAV présents mais non exprimés.

Tableau 7. PCR quantitatives sur les zones positives ou négatives en β -galactosidase

Echantillons	Nombre de copies LacZ par génome diploïde
Zones positives (1 mois)	42.75 ± 126.46 (1.02 – 559.79)*
Zones positives (3 mois)	69.17 ± 99.22 (3.14 – 492.21)*
Total zones positives (n = 51)	59.22 ± 109.69 (1.02 – 559.79)*
Zones négatives (n = 17)	0.80 ± 0.87 (0.18 – 3.35)*

* valeurs minimale et maximale pour chaque groupe

2.3. Lam-PCR

La répartition des cellules positives sous forme de clusters, ainsi que le nombre élevé de copies du transgène qu'elles contiennent, semblent indiquer une intégration de l'AAV au niveau de certains hépatocytes. Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à la technique de la Lam-PCR (linear amplification-mediated PCR). Développée dans le laboratoire du Pr. von Kalle (Heidelberg, Allemagne), cette méthode permet de mettre en évidence les jonctions entre une région d'ADN connue et une séquence d'ADN inconnue (Schmidt et al., 2007). Dans notre étude, la Lam-PCR va permettre de déterminer les sites d'intégration éventuels de nos vecteurs AAV au sein de certains hépatocytes.

Trois amas de clusters ont été analysés en Lam-PCR par l'équipe du Pr. Schmidt (Heidelberg, Allemagne) et des phénomènes intégratifs ont été mis en évidence (Tableau 8). Les gènes ciblés ont tous des fonctions très diverses, et aucune relation n'a pu être établie entre eux. De manière intéressante, dans chaque échantillon on retrouve une intégration au niveau du chromosome 1. Toutefois, ces sites sont très éloignés, et ne constitue donc pas une région-cible préférentielle de l'AAV recombinant (Figure 22).

Tableau 8. Caractérisation moléculaire des phénomènes intégratifs dans 3 clusters des rats 012 et 014 à 1 mois post injection par Lam-PCR

Echantillon	Chromosome	Gène (RefSeq)	Intron/Exon	Locus (UCSC)
012-1	1	Fchsd2		158629029
	11		In2	62859256
	11	Il1rap		76099220
012-2	1	Reps1	1n10	96614535
	5	Grik3	In1	67000855
014-3	1	Apoc2	In1	35728604

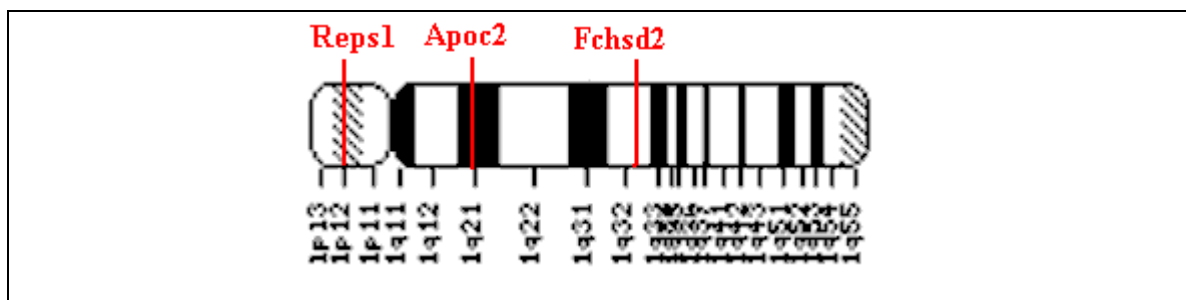


Figure 22. Localisation des sites d'intégration AAV sur le chromosome 1 du rat. Des analyses par Lam-PCR ont mis en évidence une intégration possible des vecteurs AAV au niveau du chromosome 1 dans le foie de rat injecté à 2 jours. Ces sites sont très éloignés les uns des autres, et ne semblent donc pas constituer une zone cible préférentielle pour l'insertion des AAVr dans le foie.

(Ghosh et al., 2006 ; Koeberl et al., 2008). A l'inverse, d'autres équipes ont montré une expression transitoire des vecteurs AAVr injectés dans un foie très jeune. Dans une étude utilisant le gène rapporteur codant la GFP, le pourcentage de cellules positives dans le foie chuta de 70% à 3% entre 1 et 3 semaines post injection (Cunningham et al., 2008). Une seconde équipe utilisant le même gène rapporteur montra une expression stable à long terme dans le muscle, mais d'une durée inférieure à 2 mois dans le foie (Wang et al. 2005). Des AAV2 recombinants codant la protéine déficiente dans la mucopolysaccharidose de type VII n'eurent qu'une efficacité transitoire, de moins de 16 semaines (Daly et al., 1999). Les variations observées dans ces différents protocoles peuvent être dues en partie au type de maladie ciblée, car chacune nécessite des taux de transduction très différents pour voir apparaître des améliorations phénotypiques. Dans le cadre de notre étude, les faibles taux de cellules positives obtenus à long terme ne permettent une activité enzymatique suffisante, estimée à environ 5 -10 % (Schauer et al., 2003 ; Fox et al., 1998). Chez le jeune rat, l'injection de vecteurs AAV dans le foie ne semble donc pas adaptée au traitement des maladies métaboliques héréditaires nécessitant de forts taux d'expression du transgène.

L'utilisation du gène rapporteur LacZ nous a permis de mettre en évidence des phénomènes intégratifs à 1 et 3 mois, qui furent par la suite confirmés en Lam-PCR. Cette technique montra que les sites d'intégration ne semblaient pas avoir de lien évident entre eux, que ce soit d'un point de vue spatial ou fonctionnel. Des études histologiques complémentaires n'indiquèrent aucun développement tumoral dans le foie des animaux à long terme. Cependant, cette observation de phénomènes intégratifs relance la question du risque de mutagenèse insertionnelle. Alors que l'AAV sauvage s'intègre en un site

spécifique du génome humain (AAVS1), les AAV recombinants ne semblent pas posséder de site intégratif préférentiel. Chez la souris nouveau-née, l'équipe du Pr. Sands mit en évidence une insertion des AAVr à proximité de la région-cible du miRNA-341, ayant pour conséquence une surexpression des gènes voisins (Donsante et al., 2007). D'autres études montrèrent également des phénomènes intégratifs dans le foie, mais pas dans cette région (Cunningham et al., 2008 ; Inagaki et al. , 2008).

Les causes et les conséquences de cette intégration ne sont donc pas clairement établies, et pourraient être liées au type de pathologie ciblée. Dans notre cas, c'est la première fois qu'une telle observation est réalisée chez le rat Gunn. Il est donc essentiel d'étudier plus en détails ces phénomènes. Le prochain chapitre de cette thèse aura pour but de déterminer si l'injection de vecteurs AAV chez le rat Gunn âgé de 2 jours peut potentiellement induire une croissance tumorale dans le foie.

Article : Flageul M, Aubert D, Pichard V, Nguyen TH, Nowrouzi A, Schmidt M, Ferry N. Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J Gene Med*. 2009. 118:689-696

Chapitre 2 : Etude des risques liés à l'intégration des vecteurs AAV dans le foie de rats nouveau-nés

I. Introduction

L'intégration aléatoire des vecteurs AAV dans le foie des rats Gunn peut présenter des risques, comme celui d'activer des proto-oncogènes pouvant conduire à la formation de tumeurs. Afin de tester cette hypothèse, des expérimentations combinant l'injection de vecteurs AAV à l'utilisation de composés promoteurs de tumeurs peuvent être réalisées.

De nombreuses études réalisées chez le rat ont permis de décrire les trois phases de la tumorigenèse hépatique. La première est l'étape d'initiation, qui correspond à l'acquisition de propriétés prolifératives par certains hépatocytes. Elle peut être induite par des composés chimiques tels que le diéthylnitrosamine (DEN). A ce stade, les hépatocytes initiés ont une structure encore normale, mais expriment de façon spécifique la protéine GST-P (ou GST-pi). Cette protéine appartient à la famille des glutathione S-transferases, des enzymes jouant un rôle dans la détoxification de composés cytotoxiques et carcinogènes. La GST-P est un marqueur de cellules tumorales dans de nombreux tissus, tels que le foie, l'estomac, le rein, ou le poumon. La seconde phase, dite de promotion, est l'étape de prolifération des cellules initiées. Celles-ci vont induire la formation de foyers puis de nodules tumoraux hyperplasiques (ou néoplasiques), exprimant fortement la GST-P. La phase de prolifération est la dernière étape du processus de carcinogenèse. A ce stade, le développement des nodules devient irréversible, et la formation de tumeurs malignes est possible.

Le protocole classique permettant le développement de tumeurs hépatiques est le modèle de Solt-Farber (Solt et al., 1977). Il consiste tout d'abord en une injection intrapéritonéale de DEN chez le rat adulte, afin d'induire l'étape d'initiation. Après 2 semaines, les animaux sont mis sous un régime spécial contenant 0.02% de 2-acétylaminofluorène (2-AAF), une drogue permettant la promotion des cellules initiées. On voit alors apparaître des nodules hyperplasiques après plusieurs semaines de régime, qui peuvent dériver en carcinomes à partir de 9 mois. Une hépatectomie partielle est

généralement réalisée une semaine après le début du régime, afin de bloquer la prolifération des hépatocytes normaux, et de favoriser la sélection des hépatocytes initiés.

Nous avons adapté ce protocole de Solt-Farber à l'étude des risques liés à l'intégration de l'AAVr. Dans notre expérimentation, les vecteurs AAV vont jouer le rôle d'agents potentiellement initiateurs de tumeurs. Le régime 2-AAF devrait permettre d'amplifier les cellules qui auront été potentiellement modifiées par l'intégration virale.

II. Protocole expérimental

Dans notre étude, des rats Wistar mâles ont donc reçu un régime alimentaire à base de 2-AAF, servant d'agent promoteur. Certaines cohortes ont été injectées préalablement avec des vecteurs AAV ou rétroviraux, jouant potentiellement le rôle d'agents initiateurs de tumeurs. Lors d'une première expérimentation, nous avons réalisé des hépatectomies partielles une semaine après le début du régime. Cependant, nous avons rencontré des problèmes importants de mortalité à environ 1.5 semaine post chirurgie. Nous avons donc décidé de mettre au point un second protocole, sans hépatectomie. Dans ce cas, le régime 2-AAF est laissé plus longtemps afin de voir l'apparition de nodules pré-néoplasiques (Hadjiolov et al., 1995).

Quatre groupes de rats Wistar ont été inclus dans cette étude (Figure 23). Les groupes 2, 3 et 4 ont été injectés par des vecteurs codant le gène LacZ sous contrôle d'une séquence de localisation nucléaire (*nls*). Dans le cas du groupe 2, il s'agissait de rétrovirus recombinants injectés à une dose de 5×10^9 particules infectieuses (pi) / kg. Pour les groupes 3 et 4, les vecteurs utilisés étaient des AAV 2/8 CMV *nls* LacZ à une dose de 2×10^{13} pv/kg. Pour des raisons pratiques, l'ensemble des animaux des portées a été injecté à J2. Les rats femelles ont ensuite été sacrifiés à 1 mois, au moment du sevrage, et le reste de l'étude poursuivi uniquement sur les mâles, car le régime 2-AAF est réputé pour être plus efficace chez le rat mâle.

Les groupes 1, 2 et 3 ont reçu également un régime alimentaire supplémenté en 0.02% de 2-AAF. Le groupe 1, constitué de 5 rats Wistar mâles adultes, a donc reçu uniquement le régime 2-AAF, et sert de contrôle. Le groupe 2 devrait nous permettre de

déterminer s'il existe une relation entre la formation de tumeurs et l'intégration de vecteurs dans le foie. Le groupe 3 montrera si l'injection d'AAV chez le jeune rat peut induire ou activer une carcinogenèse hépatique. Le groupe 4 n'a reçu que des vecteurs AAV à J2, et sert également de contrôle.

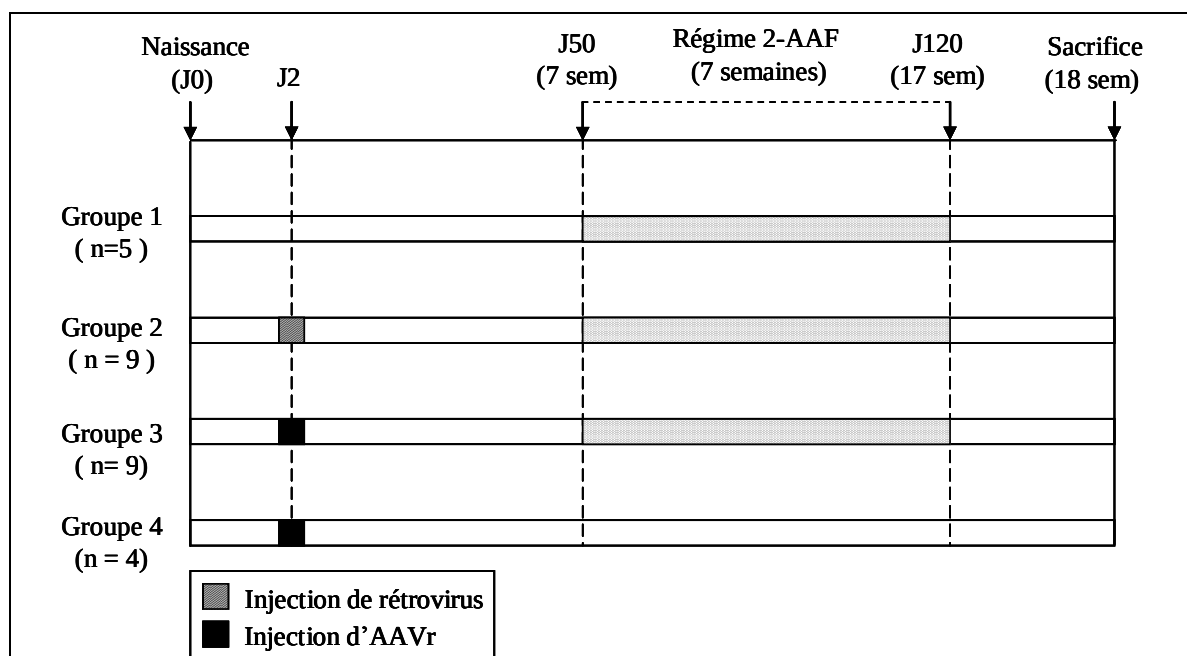


Figure 23. Représentation schématique des conditions expérimentales. Quatre cohortes de rats Wistar ont été utilisées dans cette étude. Les groupes 2, 3 et 4 ont été injectés à J2 avec des virus recombinants codant la β -galactosidase. Il s'agissait de vecteurs rétroviraux pour le groupe 2, et d'AAVr pour les groupes 3 et 4. Toutes les cohortes ont ensuite reçu un régime supplémenté en 2-AAF à l'âge adulte, excepté le groupe 4.

III. Résultats

1. Observation macroscopique du foie après traitement au 2-AAF

Au sacrifice, des nodules ont pu être observés macroscopiquement sur certains foies. Nous avons donc classé les animaux selon trois aspects possibles : de gros nodules, de petits et rares nodules, ou aucun nodule visible. La répartition pour les groupes 1, 2 et 3, est détaillée dans la figure 24. Le groupe 4, n'ayant pas reçu de régime 2-AAF, ne présentait aucun nodule. Des analyses statistiques (test de Fisher) n'indiquent aucune différence significative entre les groupes 1, 2 et 3. Une photo représentative de chaque aspect est montrée dans la figure 25.

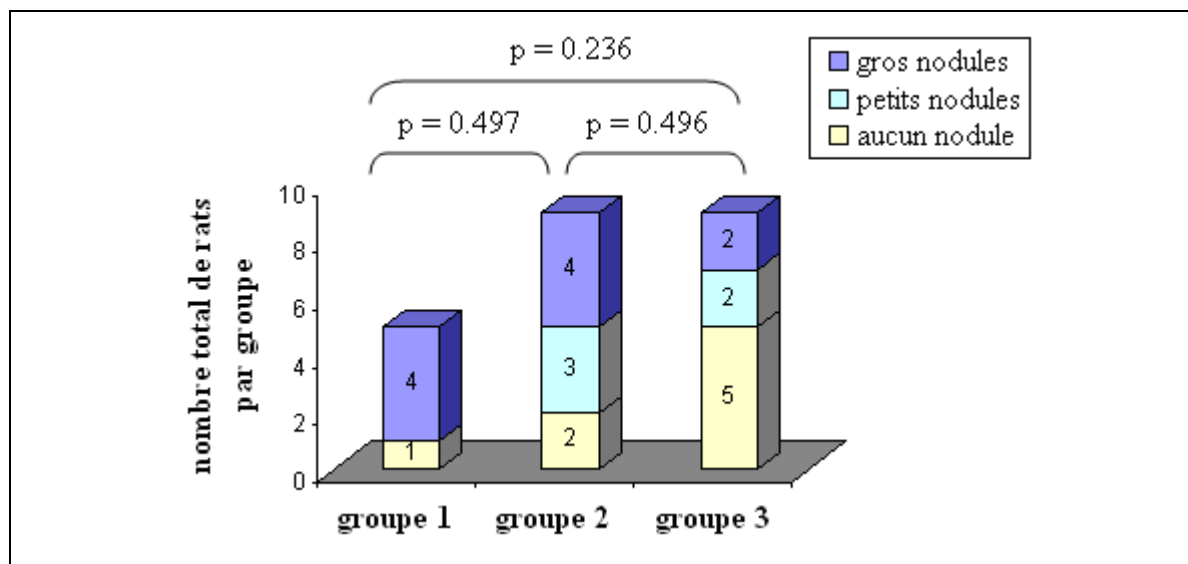


Figure 24. Répartition des animaux dans chaque groupe selon l'aspect macroscopique du foie après le régime utilisant le 2-AAF. Les échantillons de foie observés macroscopiquement ont été classés selon 3 catégories : de gros nodules, de petits et rares nodules, ou aucun nodule visible. Aucune différence significative de répartition n'a été observée entre les groupes.

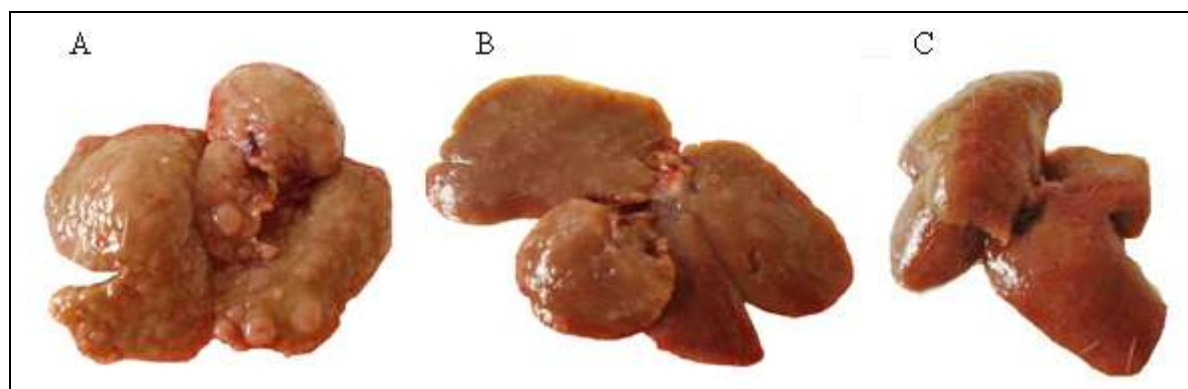


Figure 25. Aspect macroscopique du foie au sacrifice. Ces photos proviennent du groupe 2, et sont représentatives des 3 critères de classification du foie total décrits précédemment.
A : gros nodules, B : petits nodules, C : aucun nodule

2. Coloration Xgal du foie

Une coloration Xgal a été réalisée sur le foie des animaux afin de mettre en évidence les cellules positives en β -galactosidase, et de déterminer une éventuelle localisation au niveau des nodules tumoraux. Ainsi, si l'AAV peut potentiellement jouer un

rôle promoteur dans la formation de tumeurs, on s'attend à détecter des nodules positifs en Xgal chez certains rats du groupe 3, résultant ainsi d'une prolifération de cellules ayant intégré le transgène.

Les résultats ne montrent aucun nodule tumoral complètement positif en Xgal. Il est toutefois possible de trouver des cellules positives dans les nodules ou à l'extérieur (Figure 26). Le tableau 9 récapitule les observations macroscopiques du foie et les colorations Xgal. Seuls 4 animaux sur les 8 injectés par des vecteurs rétroviraux sont positifs en Xgal à long terme. En ce qui concerne les rats ayant reçu des AAVr, on observe 5 rats positifs sur 8 dans le groupe ayant subi le régime 2-AAF. La coloration Xgal fait état de clones, mais aussi de cellules positives isolées. Enfin, dans le groupe des animaux seulement injectés à J2 par des vecteurs AAV, tous sont négatifs.

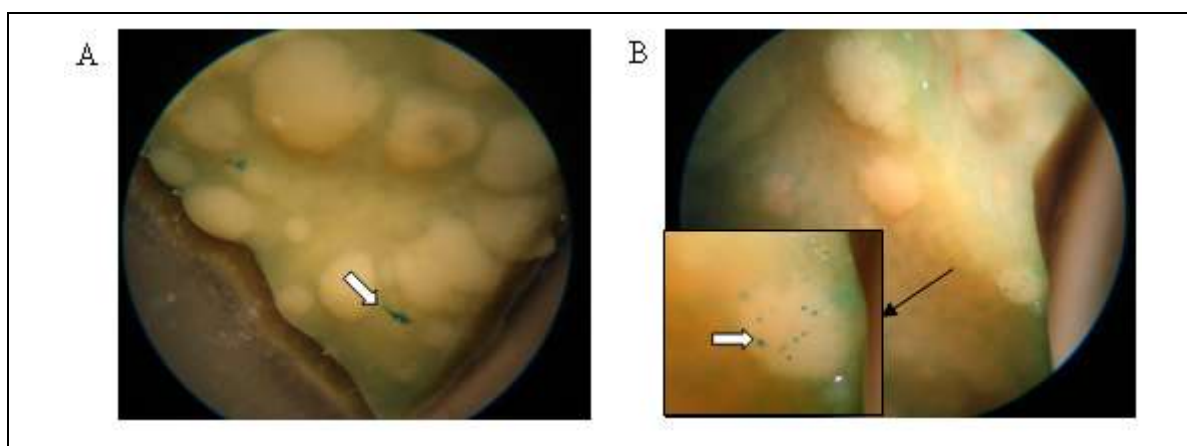


Figure 26. Observation du foie coloré en Xgal sous loupe binoculaire. La coloration Xgal révèle la présence de cellules exprimant la β -galactosidase. Elles sont réparties sous forme de clones ou de cellules isolées, dans le tissu tumoral ou sain. Les observations réalisées dans le foie de tous les rats sont décrites en détails dans le tableau 9.

A : rat 461 (groupe 2) ; B : rat 432 (groupe 3). Les flèches blanches indiquent des cellules positives.

Nous avons choisi de poursuivre notre étude sur les animaux positifs en Xgal, et plus particulièrement sur 3 rats des groupes 2 et 3. Nous avons également inclus 3 animaux du groupe 1 comme contrôles. L'ensemble de ces animaux est surligné en gris dans le tableau 9.

Tableau 9. Coloration Xgal et aspect macroscopique du foie au sacrifice (A : groupe 1, B : groupe 2, C : groupe 3, D : groupe 4)

A	Rat n°	aspect macroscopique du foie	coloration Xgal
	161	gros nodules	négatif
	162	gros nodules	négatif
	163	gros nodules	négatif
	164	gros nodules	négatif
	165	aucun nodule	négatif
B	Rat n°	aspect macroscopique du foie	coloration Xgal
	467	aucun nodule	négatif
	469	aucun nodule	négatif
	459	petits nodules	négatif
	460	petits nodules	clones isolés ou autour des nodules
	461	petits nodules	clones en dehors des nodules
	458	gros nodules	négatif
	462	gros nodules	clones en dehors des nodules
	483	gros nodules	négatif
	485	gros nodules	clones isolés ou autour des nodules
C	Rat n°	aspect macroscopique du foie	coloration Xgal
	442	aucun nodule	négatif
	446	aucun nodule	négatif
	449	aucun nodule	négatif
	454	aucun nodule	nombreux clones
	457	aucun nodule	1 clone
	436	petits nodules	quelques cellules positives en dehors et dans les nodules
	450	petits nodules	2 clones dans les nodules
	432	gros nodules	cellules positives en dehors et dans les nodules
	434	gros nodules	négatif
D	Rat n°	aspect macroscopique du foie	coloration Xgal
	471	aucun nodule	négatif
	476	aucun nodule	négatif
	477	aucun nodule	négatif
	486	aucun nodule	négatif

Au sacrifice, 56% des rats (5/9) se sont révélés négatifs en coloration Xgal dans le groupe 2, contre 44% (5/9) dans le groupe 3, et 100% (4/9) dans le groupe 4. Ceci pourrait être dû au déclenchement d'une réaction immunitaire, déjà montrée dans le précédent chapitre. Des tests ELISA ont été effectués chez tous ces animaux afin de détecter la

présence ou non d'anticorps. En effet, nous avons démontré précédemment une corrélation entre la perte d'expression du transgène et l'existence d'anticorps (cf chapitre 1). Les tests ELISA réalisées sur les rats négatifs du groupe 2 montrent des variations entre niveau d'anticorps chez les rats Xgal- (DO entre 1 et 2), cependant tous ces animaux ont des anticorps anti- β -galactosidase. Dans le groupe 3, les résultats sont plus homogènes, et on observe une présence nette d'anticorps sur les 5 rats testés. Enfin dans le groupe 4, tous les animaux ont des anticorps, ce qui explique qu'ils soient tous négatifs en coloration Xgal (tableau 8). Cette réponse anti- β -galactosidase semble donc indépendante du régime 2-AAF, car observée également dans le groupe 4 (Figure 27).

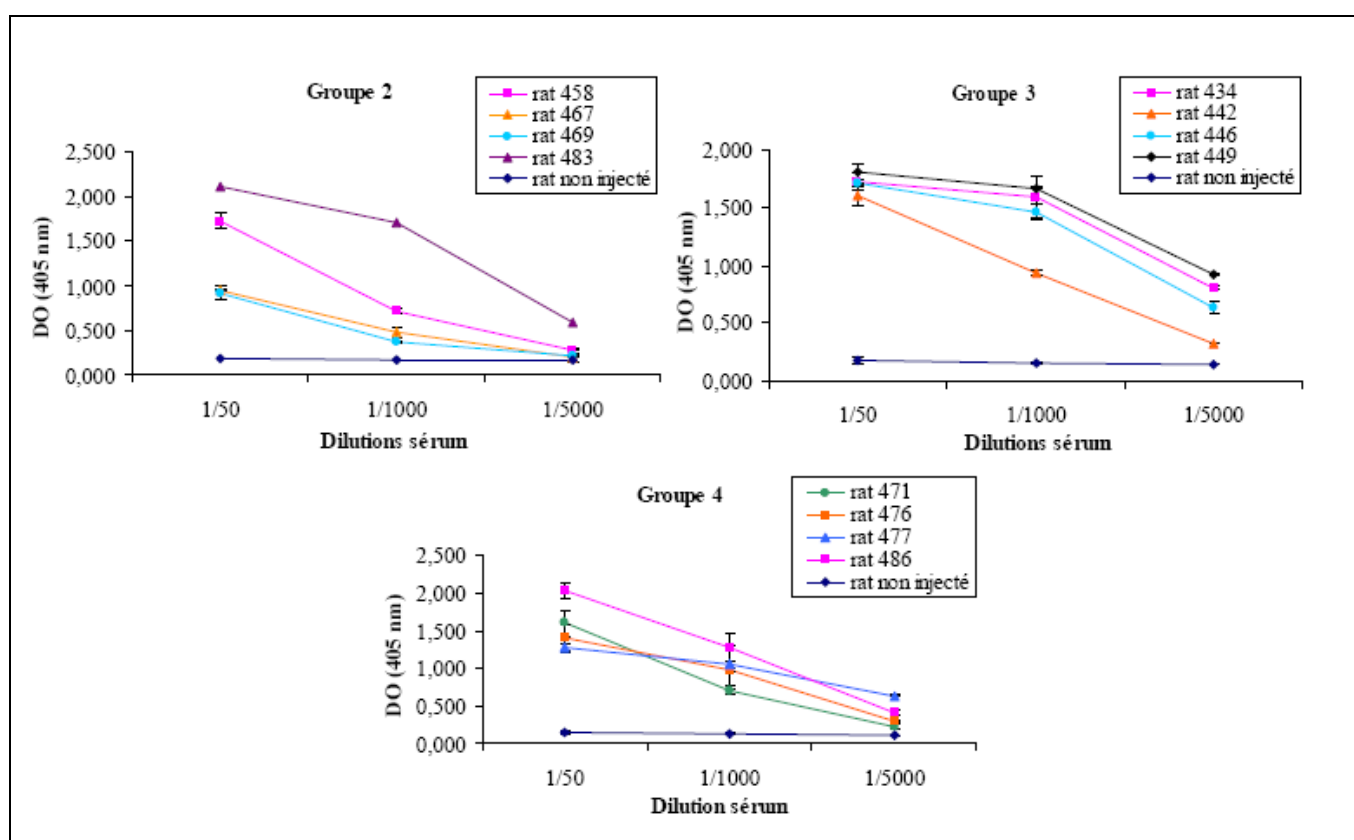


Figure 27. Tests ELISA dans le sérum des rats négatifs en Xgal. Des analyses ont été effectuées afin de déterminer si l'absence d'expression du transgène pouvait être corrélée à la présence d'anticorps dirigés contre la β -galactosidase dans le sérum. Les résultats indiquent des anticorps anti- β -galactosidase chez tous les rats négatifs en Xgal, ce qui confirme cette hypothèse.

3. Immunohistochimie

3.1. Détection des nodules prénéoplasiques dans le foie

Des coupes histologiques en paraffine ont été réalisées sur du foie puis hybridées avec un anticorps primaire dirigé contre la GST-P, et révélées avec le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine), qui colore les cellules positives en marron. Cette technique permet le marquage des lésions prénéoplasiques dans le foie (Figure 28).

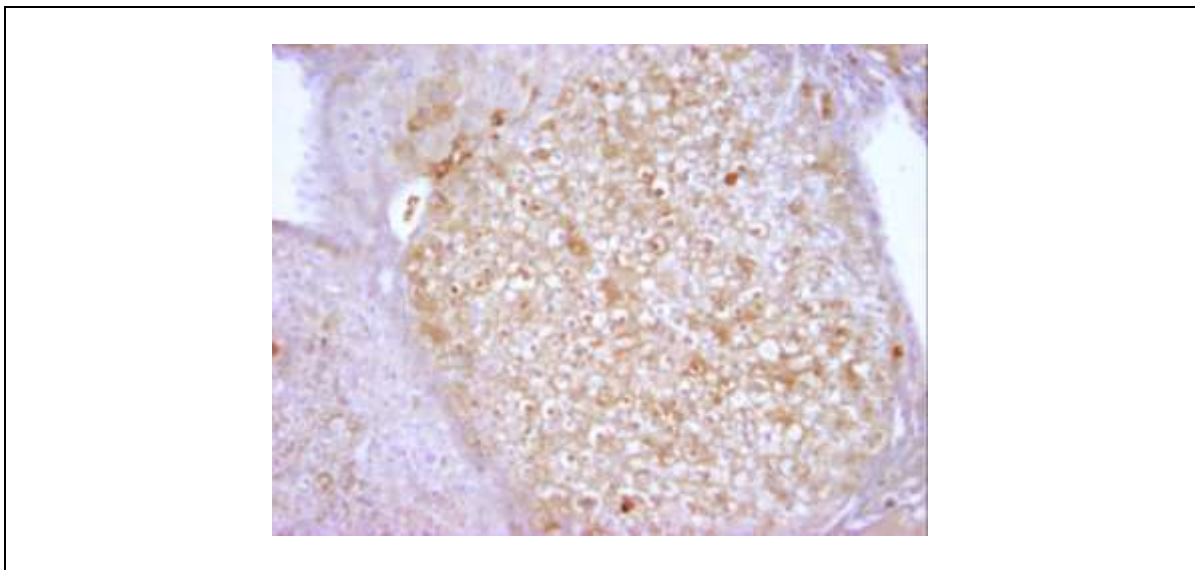


Figure 28. Marquage d'un nodule prénéoplasique dans le foie. La détection de ces nodules s'effectue grâce à un anticorps primaire dirigé contre la GST-P, une protéine exprimée dans de nombreuses cellules prétumorales.

Rat 162 (groupe 1) ; coupe en paraffine de 5 μ m ; grossissement x10

Certains nodules, qui n'étaient pas visibles macroscopiquement, apparaissent positifs sur coupes histologiques. D'une façon générale, on observe la présence de nodules GST-P dans les 3 rats de chaque groupe. Dans le groupe 1, on mesure 17.1 ± 11.6 nodules GST-P par cm^2 . Dans les groupes 2 et 3, on en compte respectivement 5.2 ± 2.9 et 6.7 ± 3.9 par cm^2 . Le test de Student n'indique aucune différence significative entre les 3 groupes ($p = 0.22$ entre les groupe 1 et 2 ; $p = 0.26$ entre les groupes 1 et 3 ; $p = 0.62$ entre les groupes 2 et 3).

3.2. Marquage des cellules exprimant la β -galactosidase

Un marquage histologique a été réalisé sur coupes en paraffine afin de comptabiliser les cellules exprimant la β -galactosidase. Dans le groupe 2 ayant reçu des vecteurs rétroviraux, on détecte de nombreux clones chez tous les animaux. Dans le groupe 3 (rats injectés avec des AAVr), on observe des clones ainsi que des cellules positives isolées (Tableau 10). Il est intéressant de noter que dans le groupe 2, les clones peuvent contenir plusieurs centaines de cellules positives, tandis que dans le groupe 3 les clones sont beaucoup plus petits, et regroupent en moyenne 3 à 30 cellules positives.

Tableau 10. Répartition des cellules positives en β -galactosidase

	Rat	Nombre de cellules β -galactosidase isolées /cm ²	Nombre de clones β -galactosidase /cm ²
Groupe 2	460	-	1.43
	461	-	0.86
	462	-	0.78
<i>Moyenne groupe 2</i>		-	<i>1.03 $\pm$ 0.35</i>
Groupe 3	432	0.00	0.79
	436	2.53	0.00
	454	14.8	3.10
<i>Moyenne groupe 3</i>		<i>5.78 $\pm$ 7.92</i>	<i>1.30 $\pm$ 1.61</i>

3.3. Co-localisation des marquages GST-P et β -galactosidase

Nous avons ensuite comparé les marquages GST-P et β -galactosidase sur des coupes sériées afin de déterminer une co-localisation ou non des clones LacZ et des nodules prénéoplasiques. La figure 29 montre le marquage de deux clones, l'un rétroviral, l'autre AAV, tous deux négatifs en marquage anti-GST-P.

Aucun clone à la fois positif en GST-P et β -galactosidase n'est détecté dans le groupe des animaux injectés avec des rétrovirus recombinants. La présence de clones

positifs en β -galactosidase confirme l'intégration de ces vecteurs dans les hépatocytes. Toutefois, l'absence de marquage GST-P semble indiquer que ces vecteurs n'induisent pas de mutagenèse insertionnelle dans le foie, contrairement à ce qui avait été observé dans le système immunitaire de 4 patients X-SCID traités par thérapie génique. Dans ce cas, les vecteurs onco-rétroviraux avaient déclenché des proliférations clonales de lymphocytes matures (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Les risques de mutagenèse insertionnelle provoqués par les vecteurs onco-rétroviraux sembleraient donc dépendants des cellules ou organes ciblés.

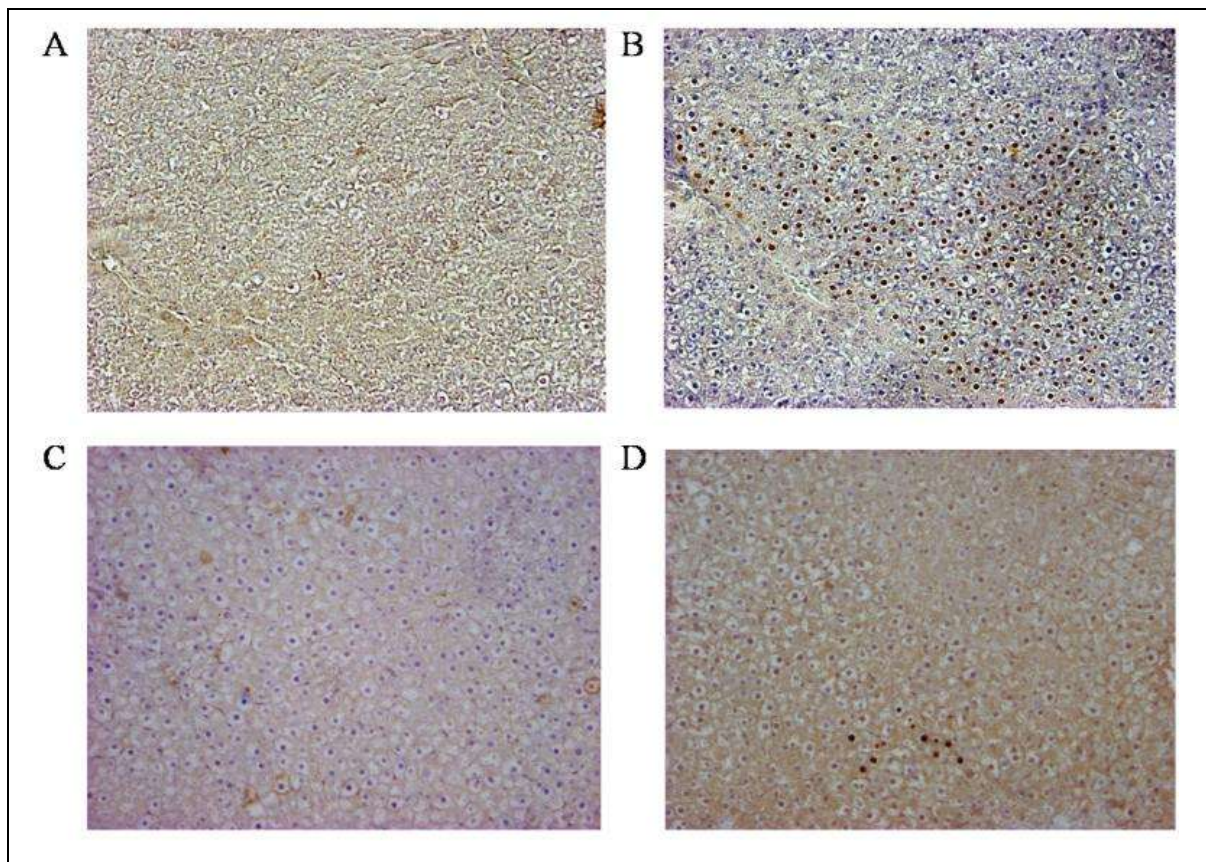


Figure 29. Co-localisation des marquages anti GST-P et β -galactosidase dans le foie. Des coupes sériées ont été hybridées par un anticorps primaire anti-GST-P (A) ou anti- β -galactosidase (B), afin de déterminer une co-localisation éventuelle des 2 marquages. Ces photos montrent un clone rétroviral (A, B) ou AAV (C, D) exprimant la β -galactosidase, mais tous deux négatifs en GST-P. Coupes en paraffine de 5 μ m ; grossissement x10

A l'inverse, nous avons observé un clone très particulier chez le rat 454, appartenant au groupe 3 injecté avec des AAVr à J2. Il s'agit d'un clone positif en β -galactosidase, constitué de 25 cellules qui sont également positives en GST-P (Figure 30).

Toutefois, nous ne disposons pas d'un nombre suffisant d'animaux pour savoir si cette observation est statistiquement significative. Des analyses supplémentaires doivent donc être effectuées, sur de plus grandes cohortes d'animaux.

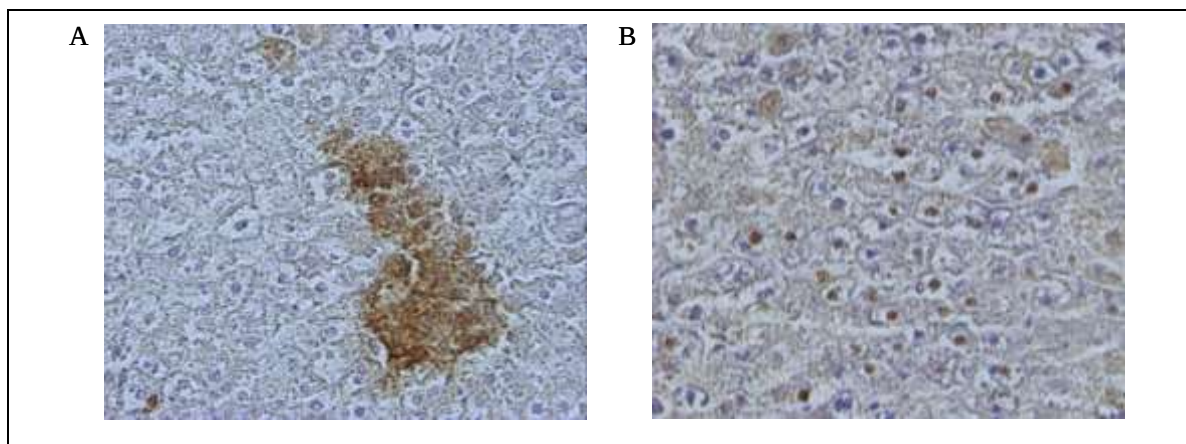


Figure 30. Observation d'un clone AAV positif en GST-P et en β -galactosidase. Des coupes en séries effectuées chez le rat 454 du groupe 3 ont révélé l'existence d'un amas de cellules exprimant à la fois les protéines GST-P (A) et β -galactosidase (B). Ceci pourrait être dû à une faible prolifération tumorale d'hépatocytes ayant intégré le transgène. Cette hypothèse n'a toutefois pas encore été confirmée.

Coupes en paraffine de 5 μ m ; grossissement x20

Nous avons donc montré que 5 rats sur 9 (soit 56%) du groupe 3 possédaient à la fois des nodules tumoraux et des clones positifs en β -galactosidase. C'est un pourcentage similaire à celui obtenu par l'équipe de Mark S. Sands (Donsante et al., 2007). Toutefois dans cette étude les souris étaient d'un fond génétique particulier, ce qui avait pu jouer un rôle dans ce taux élevé. Dans une étude sur 695 souris ayant reçu des AAVr variés, seuls 0.14% des animaux présentaient des tumeurs tandis que la valeur moyenne sur 3317 animaux non injectés, obtenue par revue de la littérature, était de 3.5 %. Toutefois, dans ce cas il s'agissait d'animaux en moyenne plus âgés (70% des souris contrôles étaient âgées de plus de 250 jours, contre seulement 35% chez les souris injectées) (Bell et al., 2005). Toutes les études actuelles visant à établir un potentiel rôle promoteur de tumeur pour les AAVr sont réalisées chez la souris, c'est pourquoi nous ne disposons d'aucun élément de comparaison dans notre modèle d'étude, le rat.

Nous avons choisi de poursuivre notre étude sur 3 animaux, ce qui représente 30% de tous les animaux du groupe de départ. En histologie, le nombre de clones positifs en β -

galactosidase était de 1.3 par cm², ce qui équivaut environ à 1.5 clone par lame, étant donné que la surface moyenne de comptage était d'environ 1.14 ± 0.27 cm². Pour 3 animaux, nous avons donc observé approximativement 4.5 clones positifs en β -galactosidase. Parmi ces clones, un seul était également positif en GST-P, soit 22%. C'est un pourcentage très élevé, mais qui doit être analysé avec prudence, étant donné la très grande variabilité entre les 3 rats étudiés. En effet, ce clone appartenait au rat qui avait la plus grande quantité de clones et de cellules isolées que les deux autres. Ce pourcentage ne correspond pas aux études déjà publiées sur la carcinogenèse chez la souris. Il est particulièrement élevé, et doit être vérifié dans des cohortes plus importantes.

IV. Conclusion

Cette étude a confirmé l'intégration des vecteurs AAV au niveau de certains hépatocytes chez le rat injecté à J2. Toutefois, les questions liées à une éventuelle tumorigenèse de ces vecteurs dans le foie restent toujours d'actualité. En effet, il semblerait que ces vecteurs n'induisent pas de prolifération carcinogène, cependant la présence d'un clone exprimant à la fois la β -galactosidase et la GST-P nous oblige à une certaine réserve.

Le nombre de clones GST-P mesuré dans les groupes ayant reçu le régime 2-AAF est dans la moyenne de ceux obtenus lors d'études précédentes (Gournay et al., 2002). Par contre, le pourcentage de clones exprimant la β -galactosidase est relativement bas, ce qui peut fausser les estimations concernant la fréquence d'apparition d'un nodule doublement marqué. Cette faible expression de β -galactosidase est en partie due à une réponse immune qui conduit à l'extinction du transgène dans un nombre élevé de nos animaux. Dans de prochaines études nous pourrions utiliser un transgène moins immunogène tel que celui codant la GFP, ou ajouter une séquence cible du miR-142-3p qui inhibe spécifiquement l'expression du transgène dans les cellules du système immunitaire. Ces expérimentations devront être réalisées sur des cohortes plus grandes, afin de permettre des analyses statistiques fiables. Une extinction à long terme du promoteur CMV par méthylation est possible dans le foie (Löser et al., 1998), donc le choix d'un autre promoteur pourrait être pertinent également.

Il pourrait être aussi intéressant de tester un autre agent promoteur. Des études ont montré que l'administration chronique d'éthanol induisait des lésions pré-néoplasiques dans le foie de rat (Pires et al., 2008), tout comme la N-nitrosomorpholine, ou le phénobarbital (Groos et al., 2007). Ces drogues n'ont cependant jamais été testées en association avec une injection de vecteurs AAV.

Chapitre 3 : Utilisation de vecteurs AAVsc pour le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 chez le rat Gunn adulte

I. Introduction

L'efficacité des vecteurs AAVsc dans le foie a été démontrée dans des modèles murins tels que la souris atteinte de déficience héréditaire en apolipoprotéine A-I (Vaessen et al., 2009) ou d'hémophilie B (Nathwani et al., 2009). Ces vecteurs ont également permis la correction à long terme du déficit en glucose-6-phosphatase chez le chien (Koeberl et al., 2009). Enfin, des AAVsc codant le facteur IX ou la sous-unité β de l'hormone gonadotrope simienne ont permis une expression à long terme de ces protéines chez le primate non-humain (Nathwani et al., 2007 ; Gao et al., 2006).

De nombreuses études ont donc établi que les AAVsc induisent une expression du transgène plus rapide et plus importante que les AAVsb. Ainsi, les doses à administrer seront très largement inférieures à celles des protocoles utilisant des AAVsb, ce qui devrait limiter le risque de réaction immunitaire. Cependant, une réponse T dirigée contre le produit du transgène a été observée récemment chez le primate non-humain, mais pas chez la souris, avec des vecteurs AAVsc (Gao et al., 2009). Les AAVr utilisés dans cette étude étaient de sérotype 7. Ce phénomène n'a pas été montré pour des AAVr d'un autre sérotype, mais c'est tout de même un paramètre à prendre en considération dans les études utilisant ce type de vecteurs.

II. Protocole expérimental

Des vecteurs AAVsc codant l'UGT1A1 humaine sous contrôle du promoteur foie-spécifique LP1 ont été produits à l'unité INSERM U649 de Nantes et dans le laboratoire du Pr. Bosma, aux Pays-Bas. Des constructions virales de trois sérotypes différents ont été réalisées (1, 5 et 8) afin de comparer leur efficacité dans le foie.

Lors des premières expérimentations nous n'avons pas observé de diminution de l'hyperbilirubinémie avec les AAVsc de sérotype 5. Des résultats similaires ont été

obtenus dans le groupe de P. Bosma, même à 1×10^{12} pv/kg, que ce soit en injection systémique ou intraportale. Ce sérotype ne semble donc pas adapté pour une transduction efficace du foie. Nous avons donc continué cette étude en nous basant uniquement sur les AAV de sérotype 1 et 8.

Les rats utilisés dans cette nouvelle étude sont des Gunn mâles -/- pesant 200 à 265g, excepté le groupe 2, constitué de rats femelles de 170g. Ces animaux ont été injectés par et deux voies d'injection ont été testées : en intra-hépatique (par la veine porte) ou en systémique (par la veine dorsale du pénis). Tous ces vecteurs ont été injectés à 5×10^{11} pv/kg, sauf dans le groupe 3, qui a reçu une dose de 1×10^{11} pv/kg (Tableau 11).

Tableau 11. Groupes inclus dans l'étude

	Vecteur	Origine	Dose injectée (pv/kg)	Voie d'injection
Groupe 1 (n = 3)	AAV8-LP1-UGT1A1	Pays-Bas	5×10^{11}	Intra- portale
Groupe 2 (n = 3)	AAV8-LP1-UGT1A1	Nantes	5×10^{11}	Intra- portale
Groupe 3 (n = 3)	AAV8-LP1-UGT1A1	Nantes	1×10^{11}	Intra- portale
Groupe 4 (n = 3)	AAV8-LP1-UGT1A1	Nantes	5×10^{11}	Voie systémique
Groupe 5 (n = 3)	AAV1-LP1-UGT1A1	Pays-Bas	5×10^{11}	Intra- portale
Groupe 6 (n = 3)	AAV1-LP1-UGT1A1	Nantes	5×10^{11}	Voie systémique

III. Résultats

Le taux de bilirubine sérique a été suivi à long terme, et l'efficacité des vecteurs a été détectée au sacrifice par des mesures de dérivés conjugués dans la bile, ainsi que par des dosages enzymatiques et des PCR quantitatives sur le foie. Des dosages d'anticorps

dans le sérum ont également été réalisés afin de déterminer la présence ou non d'une réponse immune dirigée contre le transgène.

1. Dosage de la bilirubine dans le sérum

Des prélèvements réguliers de sang ont permis le suivi de la bilirubinémie sérique à long terme. On peut observer une chute brutale du taux de bilirubine dès 2 semaines post injection, valable dans tous les groupes. Ce taux est maintenu à des valeurs très faibles pendant toute la durée de l'étude, avec cependant quelques variations entre les différentes cohortes (Figure 31).

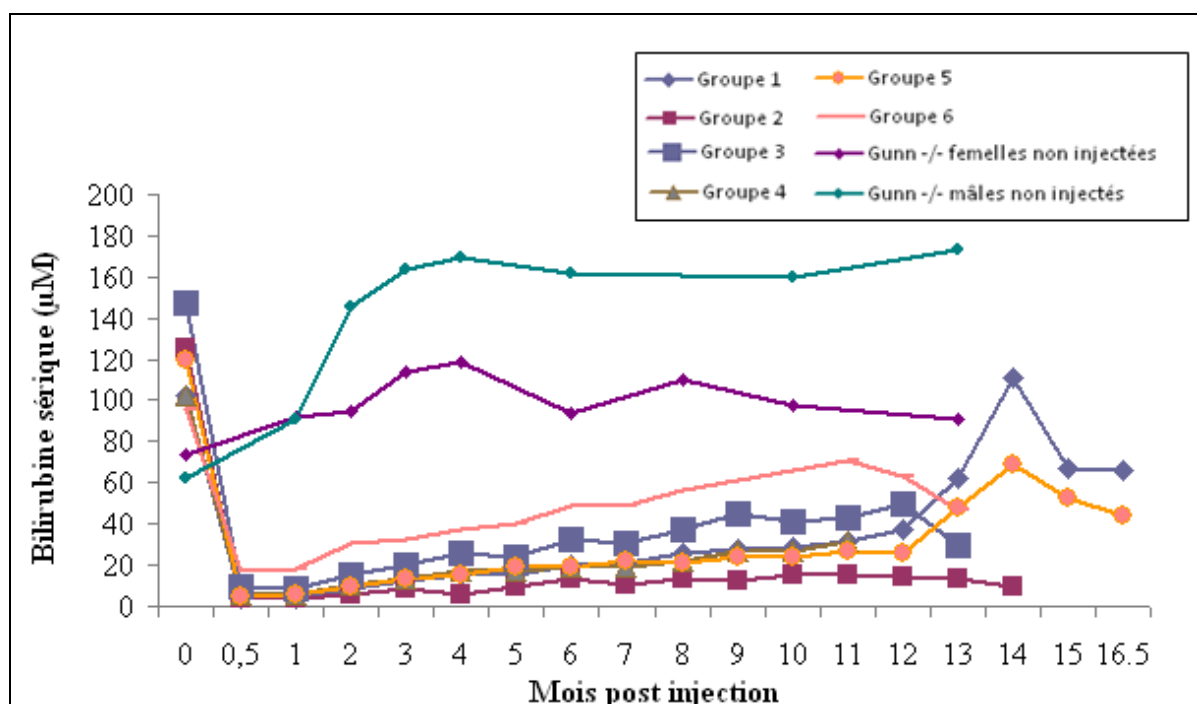


Figure 31. Suivi de la bilirubinémie dans le sérum. Des rats Gunn adultes ont reçu des vecteurs AAVsc de sérotype 8 (groupes 1 à 4) ou 1 (groupe 5 et 6) codant l'UGT1A1 humaine sous contrôle du promoteur hépatospécifique LP1. Les doses ainsi que les voies d'injection sont détaillées dans le tableau 11. Les animaux ont été régulièrement prélevés afin de doser les concentrations sériques de bilirubine totale. Une diminution très importante de l'hyperbilirubinémie est observée dès 2 semaines post injection, et persiste à long terme. La ré-augmentation transitoire du taux de bilirubine dans les groupes 1 et 5 est due à des hépatectomies partielles réalisées à 12 mois post injection.

Les animaux du groupe 1 ont reçu des vecteurs de sérotype 8 en veine porte à une dose de 5×10^{11} pv/kg. La correction de l'hyperbilirubinémie est complète jusqu'à 12 mois post injection. A cette date, une hépatectomie partielle fut réalisée afin de vérifier si les AAVr responsables de l'expression d'UGT1A1 étaient intégrés ou non. Dans un premier temps, on observe une remontée du taux de bilirubine sérique. Ceci est dû en partie au saignement de la chirurgie, et également au fait d'enlever une masse importante de foie, contenant sûrement des hépatocytes exprimant l'enzyme UGT1A1. Lors du repeuplement hépatique suivant l'hépatectomie partielle, les divisions cellulaires successives conduisent à la perte des épisomes d'AAVr non stables. A long terme, les AAVr persistent sous forme d'épisomes stables ou de formes intégrées. Les phénomènes intégratifs étant relativement rares, il est peu probable qu'ils soient seuls responsables de la re-diminution du taux de bilirubine. La présence d'épisomes stables dans le foie semblerait donc jouer un rôle important dans la persistance de la correction à long terme.

.

Les rats du groupe 2 ont reçu le même protocole, excepté l'hépatectomie partielle. Dans ce groupe, le taux de bilirubine sérique est très faible et stable pendant toute la durée de l'étude. La variation observée entre les groupes 1 et 2 pourrait être causée par l'origine différente des vecteurs (Tableau 11). Cela pourrait être également dû au fait que le groupe 1 était constitué de rats mâles, tandis que le groupe 2 ne comportait que des rats femelles. A 13 mois post injection, les taux de bilirubine moyenne des groupes 1 et 2 ($62 \mu\text{M}$ et $13 \mu\text{M}$) représentent respectivement 36% et 14% des valeurs d'individus non injectés du même sexe ($174 \mu\text{M}$ et $91 \mu\text{M}$). Le groupe 2 est donc le mieux corrigé à long terme. Dans notre laboratoire, nous n'avons jamais détecté de différence significative dans l'expression des vecteurs AAV chez le rat mâle ou femelle, mais certaines autres études ont montré que cela pouvait être le cas. De manière intéressante, ces expériences démontraient une expression plus efficace et plus importante dans le foie de souris mâles, valable à la fois pour les vecteurs AAVsb (Reyes et al. 2001 ; Loning et al. 2002) ou AAVsc (Davidoff et al., 2003 ; Wu et al., 2007). Dans notre cas, c'est l'inverse qui est observé, à savoir une meilleure expression du transgène chez les individus femelles. Ceci n'a donc jamais été décrit dans la littérature, et ne peut donc être confirmé ou infirmé actuellement.

Dans notre étude, les groupes 1 et 2 ont reçu les AAV à 5×10^{11} pv/kg. Le groupe 3, qui a reçu les mêmes vecteurs en veine porte à 1×10^{11} pv/kg seulement, montre que cette dose est suffisante pour obtenir une baisse de l'hyperbilirubinémie à long terme, mais ne

permet pas une correction totale de la pathologie. En effet, le taux de bilirubine sérique reste supérieur à 30 μ M sur le long terme.

Afin de tester l'efficacité des deux voies d'injection (intra-portale ou systémique), le groupe 4 a été injecté par la veine dorsale du pénis. La comparaison avec les résultats du groupe 1, des rats mâles ayant reçu le même type et la même dose de vecteurs, mais dans la veine porte, indique que les deux voies d'injection sont tout aussi efficaces pour des AAV de sérotype 8. Par contre, la même étude réalisée avec des AAV de sérotype 1 montre un net avantage pour l'injection intra-portale (groupe 5) plutôt que systémique (groupe 6). Tout comme le groupe 1, l'augmentation transitoire du taux de bilirubine sérique du groupe 5 à 12 semaines post injection est due à une hépatectomie partielle, faisant disparaître les épisomes, et permettant le maintien à long terme des vecteurs intégrés.

L'ensemble des résultats indique donc que les vecteurs les plus adaptés pour le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 chez le rat adulte sont les AAV de sérotype 8, injectés en veine porte à une dose de 5×10^{11} pv/kg (groupe 2). Mais dans ce cas, les animaux étaient des femelles. Si l'on compare uniquement les groupes de rats mâles, les vecteurs de sérotype 8 sont aussi efficaces en veine porte (groupe 1) qu'en systémique (groupe 4), et permettent une diminution du taux de bilirubine équivalente à celle obtenue à l'aide d'AAVr de sérotype 1 (groupe 5).

2. Comparaison entre le taux de bilirubine sérique et l'activité enzymatique dans le foie au sacrifice

Afin d'évaluer précisément l'efficacité des vecteurs à long terme, des dosages de l'activité glucuronosyltransférase (GT) ont été réalisés dans le foie puis comparés au taux de bilirubine sérique au sacrifice (Tableau 12). Cette activité enzymatique a été dosée au service de biochimie de l'hôpital Saint Joseph, à Paris.

Notre contrôle, un rat Gunn +/-, possédait une activité égale à 33.32 moles de conjugués de bilirubine par minute et par gramme de foie (moles BC / min / g). Le groupe 2, qui est le plus efficacement corrigé à long terme, est également celui qui présente la plus grande importante activité GT au sacrifice. Dans tous les autres groupes, l'activité

enzymatique est très faible, et n'est pas clairement corrélée au taux de bilirubine dans le sérum.

Tableau 12. Comparaison entre le taux de bilirubine sérique et l'activité enzymatique dans le foie au sacrifice

	Bilirubine sérique (μM)	Activité GT (moles BC/ min / g de foie)
Groupe 1	65.80 $\pm$ 14.42	0.39 $\pm$ 0.24
Groupe 2	9.50 $\pm$ 2.12	2.56 $\pm$ 0.84
Groupe 3	30.00 $\pm$ 7.07	0.88 $\pm$ 1.24
Groupe 4	23.26 $\pm$ 1.15	0.43 $\pm$ 0.04
Groupe 5	44.33 $\pm$ 10.50	0.96 $\pm$ 0.94
Groupe 6	47.0 $\pm$ 5.29	0.49 $\pm$ 0.54

3. PCR quantitatives

Des PCR quantitatives ont ensuite été réalisées afin de déterminer l'abondance de transgènes dans le foie au sacrifice. Le nombre de copies d'UGT1A1 par génome diploïde est assez faible, excepté pour le groupe 2, où les valeurs obtenues sont 2 à 5 fois plus élevées que celles de tous les autres groupes (Tableau 13). Elles sont cependant similaires à celles de nos contrôles, 2 rats Gunn corrigés à long terme après une injection intraportale d'AAV8-mTTR-UGT1A1. Il semblerait donc que des nombres de copies relativement faibles suffisent à corriger efficacement le rat Gunn à long terme.

En ce qui concerne les groupes 1 et 5, on n'observe pas de variation significative entre le nombre de copies avant et après hépatectomie, ce qui voudrait dire que la majorité des vecteurs AAV sont sous forme intégrée à long terme dans le foie.

Tableau 13. PCR quantitatives sur le foie de rats Gunn injectés par des AAVsc codant l'UGT1A1

	Nombre de copies UGT1A1 par génome diploïde	
	à l'hépatectomie	au sacrifice
Groupe 1	0.032 ± 0.001	0.028 ± 0.004
Groupe 2	nd	0.153 ± 0.055
Groupe 3	nd	0.027 ± 0.009
Groupe 4	nd	0.056 ± 0.020
Groupe 5	0.026 ± 0.010	0.041 ± 0.001
Groupe 6	nd	0.031 ± 0.009
Contrôles	nd	0.036 ± 0.015

nd : non déterminé (pas d'hépatectomie pour ces groupes)

4. Présence de dérivés conjugués dans la bile

La bile a été récupérée au sacrifice afin d'y détecter la présence de dérivés conjugués. Ces mesures ont été réalisées au service de biochimie de l'hôpital Saint Joseph, à Paris. La présence de dérivés conjugués dans la bile est une preuve de conjugaison efficace de la bilirubine. Un rat Gunn -/- non traité possède 100% de bilirubine non conjuguée, et 0% de conjugués. Dans notre étude, la présence de dérivés conjugués dans la bile de tous les animaux indiquent qu'ils sont tous corrigés, plus ou moins efficacement (Figure 32).

On ne peut déterminer de corrélation précise entre le pourcentage de dérivés conjugués et le niveau de correction. Par exemple, les rats du groupe 6 ont le taux le plus important de dérivés mono- et di-conjugués, alors que la correction de l'hyperbilirubinémie dans ce groupe n'était que partielle. Ce pourcentage de dérivés est similaire à celui du groupe 2, dans lequel on avait observé la forte diminution du taux de bilirubine dans le sérum.

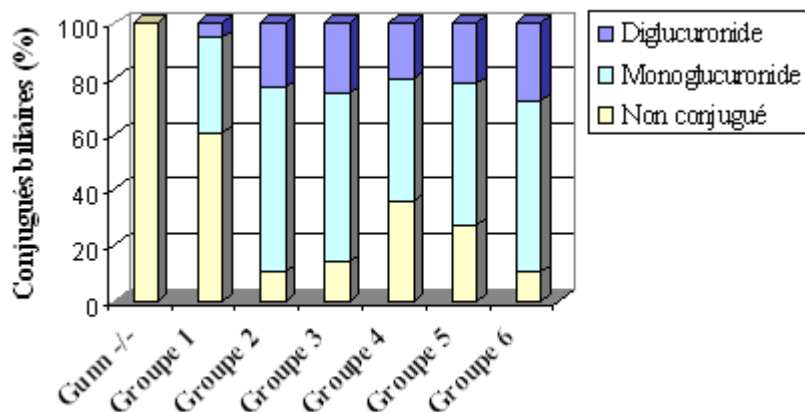


Figure 32. Proportion de dérivés conjugués dans la bile de rats Gunn ayant reçu des AAVsc codant l'UGT1A1. Au sacrifice, la bile de tous les animaux a été récupérée, puis la présence de dérivés conjugués a été évaluée par dosage biochimique. La présence de ces dérivés chez tous les animaux témoignent d'une activité efficace de l'UGT1A1 humaine apportée par les vecteurs AAV. Le contrôle négatif de cette expérimentation est un rat Gunn -/- non traité, n'ayant aucune activité enzymatique UGT1A1, et possédant donc 100% de bilirubine non conjuguée.

5. Dosage d'anticorps anti-UGT1A1 dans le sérum

Une étude récente réalisée chez la primate non-humain a montré que l'injection de vecteurs AAVsc dans le foie pouvait induire une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène (Gao et al., 2009). Des tests ELISA ont donc été effectués sur tous les animaux de notre projet, et indiquent qu'aucun rat ne possède des anticorps anti-UGT1A1 à long terme (Figure 33).

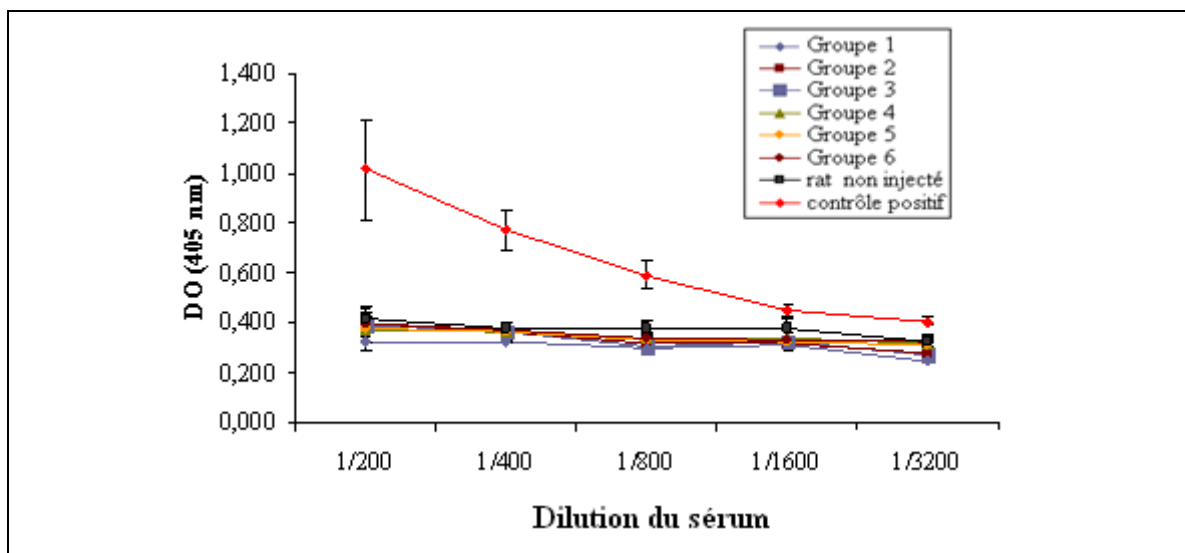


Figure 33. Détection d'anticorps dirigés contre l'UGT1A1 humaine. Des tests ELISA ont été réalisés afin de déterminer la présence ou non d'anticorps dirigés contre l'UGT1A1 à long terme dans le sérum. Dans notre étude, aucun rat n'a développé d'anticorps contre le produit du transgène. Contrôle positif : rat injecté avec du rétrovirus recombinant exprimant l'UGT1A1

6. Immunohistochimie

L'injection de vecteurs AAV peut entraîner certaines lésions hépatiques à long terme chez le rat. Ainsi, l'équipe du Pr. Bosma a observé la présence de larges nodules blancs visibles macroscopiquement sur le foie de rats Gunn, deux ans après leur injection par des AAVsb codant l'UGT1A1. Ces nodules n'étaient pas visibles chez les animaux des groupes non injectés. Des analyses histologiques ont montré des structures lipidiques dans le foie des animaux injectés, ainsi que sur certains rats contrôles (Seppen et al., 2006).

Des coupes histologiques en paraffine ont été réalisées pour tous les rats de notre étude. Ces lames ont été colorées en hémalun et phloxine afin de révéler la structure hépatique. Dans tous les cas, la structure macroscopique générale du foie était complètement normale. Toutefois, on a observé des amas graisseux chez deux rats, l'un du groupe 1, l'autre du groupe 3 (Figure 34A). Cette stéatose, très localisée, n'est retrouvée chez aucun autre animal. Une accumulation transitoire de glycogène a également été détectée chez un autre rat du groupe 1 (Figure 34B). Cette surcharge glycogénique est un phénomène tout à fait physiologique.

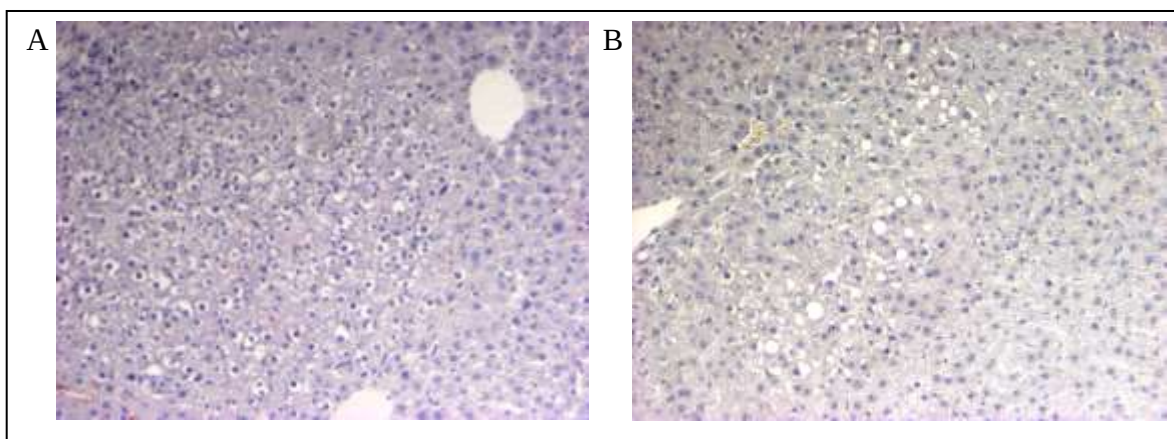


Figure 34. Coloration hémalun / phloxine sur du foie de rats injectés par des AAVsc codant l'*UGT1A1*. Des coupes histologiques de foie ont été réalisées au sacrifice. Tous les animaux ont une structure hépatique normale. Toutefois, chez 3 animaux on observe de rares lésions, très localisées. Il s'agit de stéatose (A) ou de surcharge en glycogène (B), des affections pouvant être rencontrées chez des animaux âgés.

Coupes en paraffine de 5 μ m ; grossissement x10

IV. Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré que l'utilisation d'AAVsc codant l'*UGT1A1* humaine sous contrôle du promoteur foie-spécifique LP1 permet la correction de l'hyperbilirubinémie à long terme chez le rat Gunn adulte. Le protocole le plus efficace semble être basé sur l'utilisation de sérotype 8 en injection intraportale, à 5×10^{11} pv/kg. Les quantités de copies du transgène détectées dans le foie par qPCR, ainsi que les valeurs d'activité enzymatique, sont relativement faibles, et semblent indiquer qu'un taux de transduction limité permet une activité enzymatique suffisante pour observer une diminution significative de l'hyperbilirubinémie à long terme. La présence de dérivés conjugués dans la bile prouve également que l'*UGT1A1* humaine apportée est fonctionnelle. Des tests ELISA n'ont révélé la présence d'aucun anticorps dans le sérum, démontrant ainsi l'absence de toxicité de nos vecteurs.

Ces résultats sont très encourageants, et doivent maintenant être confirmés chez le primate. Nous espérons que les résultats obtenus avec ces vecteurs AAVsc permettront le développement d'un essai clinique de thérapie génique pour la maladie de Crigler-Najjar de type 1. Ce protocole pourrait également être applicable à d'autres pathologies, étant

donné le caractère modèle de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 pour les maladies métaboliques héréditaires.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Le foie est le siège de nombreuses pathologies métaboliques potentiellement candidates à des essais de thérapie génique. La maladie de Crigler-Najjar de type 1 apparaît comme un bon modèle, notamment car il existe un modèle animal naturel de cette pathologie : le rat Gunn. Tous les vecteurs viraux disponibles actuellement en thérapie génique ont été testés chez ce modèle par notre laboratoire ou d'autres équipes. L'injection de vecteurs rétroviraux chez le rat Gunn adulte ne permit qu'une correction à court terme de la pathologie, due au déclenchement d'une forte réponse cytotoxique (Aubert et al., 2002). Cette réponse immune ne fut pas observée chez des rats injectés à l'âge de 1 ou 2 jours, ce qui permit leur guérison pendant toute la durée de l'étude (Bellodi-Privato et al., 2005). Une correction à long terme fut également obtenue grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux chez le rat nouveau-né, malgré la détection d'anticorps dirigés contre l'hUGT1A1 (Seppen et al., 2006). Dans notre laboratoire, une correction similaire fut obtenue sans qu'aucun anticorps contre le produit du transgène ne soit détecté (Nguyen et al. 2005). Chez le rat Gunn adulte, l'injection de vecteurs adénoviraux « gutless » fut responsable d'une correction complète de la pathologie pendant environ 2 ans, sans réponse immune (Toietta et al., 2005).

Les vecteurs décrits en thérapie génique le plus récemment sont les AAVr. Ils sont réputés pour être non immunogènes et non intégratifs, ce qui leur confère un avantage sécuritaire par rapport aux précédents vecteurs. Différents sérotypes sont disponibles, apportant un tropisme tissu-spécifique. Les AAVr ont été utilisés dans de nombreux protocoles de thérapie génique pour les maladies métaboliques héréditaires. Les premières études utilisaient des AAVr de sérotype 2. Ils induisirent une correction stable et à long terme de la pathologie chez la souris déficiente en α -antitrypsine et chez le chien hémophile (Song et al., 2001 ; Mount et al., 2002). Des AAVr de sérotype 8, ayant un fort tropisme pour le foie, furent utilisés pour la traitement à long terme de l'hypercholestérolémie familiale chez la souris (Lebherz et al., 2004). Chez le rat Gunn, les AAV sérotypes 1 et 8 se sont révélés être les plus efficaces pour obtenir une diminution significative de l'hyperbilirubinémie à long terme (Seppen et al., 2006).

Etant donné le caractère très grave de la maladie de Crigler-Najjar, il semblerait intéressant d'établir des protocoles applicables au très jeune patient. Pour cela, il faut donc parvenir à corriger efficacement le jeune rat Gunn. La première partie de ma thèse a consisté en une étude de l'efficacité des vecteurs AAV après injection chez le rat âgé de 2 ou 14 jours. Nous avons choisi d'utiliser des AAVr de sérotype 8, au vu des résultats obtenus par Seppen et al., et parce que de nombreuses autres études ont également montré son fort tropisme hépatique.

Nous avons injecté des vecteurs AAV8 codant l'UGT1A1 humaine sous contrôle du promoteur ubiquiste CMV, chez des rats âgés de 2 jours ou de 2 semaines. Ces vecteurs ont permis une diminution significative du taux de bilirubine dans les 2 groupes, restant significative pendant plusieurs semaines malgré une remontée importante. Cette ré-augmentation partielle du taux de bilirubine est due en partie à la croissance du foie chez le jeune animal, qui va éliminer les AAVr sous forme épisomale. Elle pourrait également être due à une extinction du promoteur CMV au niveau de certaines cellules, à cause du phénomène de méthylation (Löser et al., 1998). Toutefois, ce promoteur a déjà été utilisé chez le rat Gunn adulte, et avait permis une diminution de l'hyperbilirubinémie jusqu'à 82 semaines, grâce à des AAVr de sérotype 1 et 8, chez des rats Gunn adultes (Seppen et al., 2006). Une autre hypothèse est le déclenchement d'une réponse immune. C'est peu probable, car la remontée du taux de bilirubine aurait sûrement été plus rapide. Des anticorps anti-UGT1A1 avaient été détectés dans l'étude sur le rat Gunn adulte, mais n'avait pas empêché une correction de l'hyperbilirubinémie à long terme. Malgré tout, c'est un paramètre que nous aurions dû mesurer chez nos animaux.

La persistance d'une faible correction à long terme chez les rats ayant reçu les AAVr codant l'UGT1A1 humaine, malgré la diminution du nombre d'hépatocytes transduits, suggère que cette activité enzymatique résiduelle pourrait impliquer une conjugaison par d'autres organes. Ceci est possible car nous avons utilisé un promoteur ubiquiste, et que la bilirubine non conjuguée circule librement dans la circulation sanguine. Des études précédentes ont montré qu'il était en effet possible de faire conjuguer la bilirubine par des cellules non hépatiques. Seppen et al. démontrèrent que l'administration intra-péritonéale de fibroblastes immortalisés et transduits par des vecteurs onco-rétroviraux permettait une diminution du taux de bilirubine sérique. Malheureusement, les rats furent victime d'un développement tumoral dû à la croissance de ces fibroblastes immortalisés

(Seppen et al., 1997). Une autre étude montra que des injections répétées d'ADN plasmidique dans le muscle de rats Gunn permettaient une diminution significative du taux de bilirubine (Jia et al., 2005). Cependant, le taux de transduction dans le foie ne fut pas évalué, et on ne peut exclure son rôle dans cette correction partielle de l'hyperbilirubinémie, car dans ce cas le gène de l'UGT1A1 était sous contrôle du promoteur ubiquiste CMV.

Dans notre laboratoire, lors d'études préliminaires nous avons observé que l'utilisation d'AAVr portant le gène rapporteur LacZ sous contrôle du promoteur CMV permettait une expression importante du transgène dans le foie, mais permettait également une transduction efficace du muscle squelettique. Nous avons ensuite voulu déterminer si de vecteurs codant l'UGT1A1 humaine sous contrôle du promoteur muscle-spécifique desmine permettait une diminution de l'hyperbilirubinémie, qui serait donc due à une activité efficace dans le muscle. Nos premiers résultats montrent qu'une normalisation de l'hyperbilirubinémie est possible mais de façon transitoire seulement, malgré la persistance de l'ADNc de l'UGT1A1 à long terme dans le muscle, et la présence de faibles quantités de protéines. Cette efficacité partielle ne semble pas due au déclenchement d'une réponse immune contre la protéine, malgré la présence de faibles taux d'anticorps anti-UGT1A1 dans le sérum. Il est plus probable que le muscle ne soit pas totalement adapté au métabolisme de la bilirubine. Les facteurs limitants pourraient être, par exemple, une entrée perturbée de la bilirubine libre dans la cellule musculaire, ou une expression enzymatique moins efficace. Des études complémentaires sont en cours afin de tester ces hypothèses.

Une autre hypothèse serait la persistance de l'expression à long terme sous une forme intégrée, au niveau de quelques hépatocytes. L'un des inconvénients du gène de l'UGT1A1 est qu'il ne peut être détecté *in situ*. Il n'est donc pas possible de localiser les cellules positives, et donc d'établir s'il y a eu une diminution du nombre de cellules exprimant le transgène au cours du temps. Nous avons donc continué notre étude avec des AAV8 recombinants portant le gène LacZ, qui code la β -galactosidase d'E.Coli, afin de mesurer précisément le taux de transduction chez des rats âgés de 2 jours. L'utilisation de ces vecteurs a induit une forte expression de β -galactosidase à 7 jours, puis une baisse importante de l'expression du transgène dès 1 mois post injection, dans de nombreux animaux. Des anticorps anti- β -galactosidase ont été détectés chez tous les animaux

négatifs. Cette réponse immune est peut être due au gène LacZ, réputé comme immunogène

Chez les rats positifs, l'expression du transgène à long terme s'effectue sous forme de clones, suggérant une intégration de l'AAVr au niveau de certains hépatocytes. Par qPCR, nous avons montré que les clones contenaient en moyenne 75 fois plus de copies du transgène que le tissu négatif environnant. Des expériences de Lam-PCR, réalisées par l'équipe du Pr. Schmidt (Heidelberg, Allemagne), ont eu pour but de localiser précisément ces sites intégratifs. Les premiers résultats montrent que cette intégration semble due au hasard, malgré la présence de plusieurs sites intégratifs au niveau des chromosomes 1 et 11. Toutefois, ces mesures n'ont été réalisées que sur trois groupes de clones, isolés de deux animaux seulement. De nouvelles études doivent donc être réalisées sur de plus grands échantillons, afin de vérifier si cette intégration est vraiment due au hasard, ou s'il existe des sites intégratifs préférentiels. Il pourrait être intéressant d'analyser des zones négatives afin de vérifier une éventuelle intégration, car nous avons déjà établi par qPCR que ces cellules possédaient en moyenne 0.80 copies de transgène par génome diploïde.

Cette intégration des vecteurs AAVr dans le foie des rats injectés à 2 jours, qui, pour l'instant, semble due au hasard, soulève le risque de mutagenèse insertionnelle. Les seules études sur la possibilité de développement tumoral par des vecteurs AAV ont été réalisées chez la souris (Bell et al., 2006 ; Donsante et al., 2001). Lors d'une récente étude réalisée chez la souris nouveau-née atteinte de déficience en β -glucuronidase, l'équipe de Mark S. Sands a observé une intégration des vecteurs à proximité de la région-cible du miRNA-341. Ceci induisait une surexpression des gènes voisins de cette région (Donsante et al., 2007). D'autres études montrent également que des phénomènes intégratifs dans le foie étaient possibles, mais en dehors de cette région (Cunningham et al., 2008 ; Inagaki et al., 2008).

La seconde partie de mon travail de thèse avait pour but d'établir si l'intégration des AAVr dans le foie de rats injectés à J2 pouvait induire une prolifération tumorale. Malgré le fait qu'aucune étude de ce type n'ait encore été réalisée chez le rat, nous nous sommes servis des protocoles de carcinogenèse disponibles pour ce modèle animal. Nous avons adapté le protocole de Solt-Farber, en utilisant le 2-acétylaminofluorène (2-AAF) comme agent promoteur, et l'AAVr comme agent potentiellement initiateur de tumeurs. L'observation macroscopique du foie indiqua que l'administration d'AAVr porteurs du

gène LacZ n'induisait pas de prolifération tumorale anormale. Le comptage immunohistochimique des nodules positifs en GST-P, une enzyme permettant le marquage des lésions prénéoplasiques, confirma cette hypothèse. Des marquages histologiques anti- β -galactosidase ou anti-GST-PI sur des coupes sériées ont montré que la majorité des clones positifs en β -galactosidase, et qui donc avaient intégré des vecteurs AAV, étaient négatives en GST-P. Cependant, nous avons détecté la présence d'un clone de quelques cellules positives à la fois en β -galactosidase et en GST-P, qui serait donc dû à une faible prolifération tumorale de cellules ayant intégré le transgène. Ceci n'est pour l'instant qu'une hypothèse, qui devra être confirmé par Lam-PCR.

Des études complémentaires sont nécessaires afin d'établir si ce clone est un phénomène isolé, ou s'il existe un risque significatif de développement tumoral induit par les AAVr dans le foie de rat nouveau-né. Lors de nos prochaines études, nous utiliserons un autre transgène, car le gène LacZ, très immunogène, conduit à une diminution importante du nombre d'animaux positifs à long terme. De ce fait, nous risquons de ne pas avoir assez d'animaux pour permettre des analyses statistiques. Ce fut le cas de l'étude présentée dans ce mémoire. Notre groupe contrôle, qui n'a reçu que les AAVr, s'est avéré totalement négatif en β -galactosidase. Cette observation fut corrélée avec de forts taux d'anticorps sériques dirigés contre cette protéine. Le problème est similaire avec le choix du promoteur CMV, qui peut s'éteindre à long terme dans le foie. La meilleure stratégie pour de prochaines expérimentations serait donc d'utiliser un AAVr portant un autre transgène et/ou promoteur, afin d'augmenter les probabilités d'avoir des rats positifs à long terme. Le gène codant la GFP semble être une bonne option, car la protéine GFP peut être détectée in situ par fluorescence ou par immunohistochimie. Un nombre plus important d'animaux devra être injecté, afin de contrecarrer également les variabilités inter-individuelles. Enfin nous pourrons également tester d'autres drogues promotrices de tumeurs, afin de tester si elles peuvent avoir un rôle dans le développement de nodules positifs en β -galactosidase. L'idéal serait d'avoir un composé actif à la fois chez le rat et la souris, afin de pouvoir comparer les effets de l'intégration des vecteurs AAV dans ces deux modèles animaux.

Il semblerait donc que l'injection de vecteurs AAV chez le rat nouveau-né ne soit pas adaptée au traitement de pathologies métaboliques. En effet, l'expression du transgène, bien qu'importante dans les premières semaines suivant l'injection, diminue ensuite de

façon considérable. Le pourcentage de cellules positives à long terme est faible, ce qui semble induire un taux de transduction résiduel trop faible pour obtenir une correction phénotypique importante. Malgré cela, la gravité de la maladie de Crigler-Najjar de type 1, et d'autres maladies génétiques héréditaires, fait qu'il est nécessaire de traiter les patients le plus tôt possible. Une stratégie envisageable serait d'injecter les patients très jeunes, afin d'induire une chute du taux de bilirubine, puis de ré-injecter ces patients à l'âge adulte, lorsque le taux de bilirubine remonte. Ceci est possible en utilisant deux AAVr de sérotype différents, afin d'éviter tout risque de réponse immune, mais possédant chacun un bon tropisme pour le foie.

Récemment, de nouveaux types d'AAVr ont été développés, les AAVsc. Ce sont des vecteurs auto-réplicatifs, indépendants pour la synthèse du second brin d'ADN. Ils permettent une transduction plus efficace et plus rapide que les AAV classiques. Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons testé l'efficacité des vecteurs AAVsc pour le traitement de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn adulte. Des AAVsc de trois sérotypes - 1, 5 et 8 - et codant l'UGT1A1 sous contrôle du promoteur hépato-spécifique LP1, ont été dans l'unité INSERM U649 (« Vecteurs viraux et transfert de gènes in vivo ») de Nantes, ou par l'équipe du Pr. Bosma (AMC Liver Center, Amsterdam, Pays-Bas). Les AAV5 se sont avérés inefficaces, tandis que les sérotypes 1 et 8 ont conduit à une diminution stable du taux de bilirubine sérique pendant plus d'un an, sans la détection d'aucun anticorps anti-UGT1A1. Les valeurs les plus faibles de bilirubine furent obtenues avec les AAVsc de sérotype 8 en injection intraportale, à 5×10^{11} pv/kg. L'analyse du foie au sacrifice par qPCR révéla la présence de faibles quantités de copies du transgène, mais qui semblaient donc permettre une expression suffisante d'UGT1A1 à long terme. De faibles valeurs d'activité enzymatiques ont également été détectées, confirmant ainsi qu'une expression même limitée du transgène est suffisante pour obtenir une correction phénotypique, attestée par la présence de dérivés conjugués dans la bile des animaux traités.

Ce protocole va prochainement être poursuivi chez le primate non-humain. Il faudra prendre en compte le risque de réponse immune, car des études ont montré que la présence d'anticorps dirigés contre la capside virale pouvait induire une forte réponse immune. Ceci est dû à l'existence possible d'une primo-infection par l'AAV sauvage chez l'Homme et le primate non-humain. De plus, une réponse est possible également contre produit du transgène, qui peut être reconnu comme non soi. Cela peut être le cas dans notre étude,

l'UGT1A1 humaine pouvant être considérée comme exogène chez exogène. Une immuno-modulation pourrait donc s'avérer nécessaire. Les vecteurs utilisés seront des « self complementary », qui nécessitent de plus faibles doses, comparé aux AAV classiques simples brins. Cela pourrait avoir un effet bénéfique, en limitant une éventuelle toxicité liée à une charge virale trop importante. Enfin, il faudra évaluer le risque d'intégration dans le foie de ces animaux, aux vues de nos résultats préliminaires chez le rat.

Les études réalisées chez l'animal s'effectuent sur une échelle de temps relativement courte, quelques années tout au plus. Ceci est donc difficilement transposable à l'Homme. De plus, du fait de leur confinement, les animaux d'élevage sont moins susceptibles aux agressions par des pathogènes extérieurs (bactéries, virus). D'autres paramètres tels que le comportement alimentaire, la consommation d'alcool, etc., peuvent influencer l'état général du foie humain, sans comparaison possible avec l'animal. Enfin, l'Homme peut être sujet à diverses pathologies telles que des hépatites, qui peuvent potentiellement perturber l'expression à long terme des AAVr dans le foie. Une réinjection pourrait donc s'avérer nécessaire. L'utilisation d'un autre sérotype, la mutation de certains épitopes de la capside, ou la production de vecteurs hybrides, sont autant de stratégies qui envisageables afin de limiter les risques de réponse immune contre la capside virale

Malgré le fait d'être une maladie rare, la maladie de Crigler-Najjar de type 1 est surtout un modèle pour de nombreuses pathologies visant le foie, et les résultats obtenus pourraient donc servir de base pour le traitement de nombreuses maladies métaboliques héréditaires. Les vecteurs AAV permettant l'encapsidation de gènes ayant une taille maximale de 4.7 kb, l'utilisation de ces vecteurs ne semble donc pas adaptée à toutes les pathologies. Cependant, les techniques de production d'AAVr ont évolué, et la méthode de trans-épissage pourrait notamment palier ce problème.

Si les résultats chez le primate non-humain sont concluants, ils devraient conduire à un essai clinique de thérapie génique de la maladie de Crigler-Najjar de type 1 par des AAVsc recombinants, grâce à la mise en place d'un réseau regroupant les différentes équipes européennes travaillant sur cette pathologie. L'espoir est grand en ce qui concerne les résultats de cet essai de thérapie génique, car il s'agirait du premier protocole de ce type pour le traitement de la maladie de Crigler-Najjar de type 1.

ANNEXE I - MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Production des vecteurs

Les vecteurs utilisés ont été produits au Laboratoire de Thérapie Génique du CHU de Nantes (INSERM U649), ou à l'Academic Medical Center (AMC, Pays-Bas) grâce à une collaboration avec le Pr. Bosma. La première étape de production consiste à co-transfecter des cellules de la lignée 293RS (cellules humaines exprimant la protéine E1, qui permet de démarrer le cycle viral) par un plasmide vecteur portant le gène d'intérêt et par un plasmide auxiliaire portant les séquences Rep et Cap. La purification s'effectue par double gradient de chlorure de césium suivi d'une dialyse. La titration en particules virales est réalisée par Dot Blot.

II. Expérimentations animales

1. Reconnaissance phénotypique des rats Gunn

Les animaux sont maintenus à des cycles journaliers d'alternance 12 heures jour/12 heures nuit et alimentés *ad libitum* avec un libre accès à l'eau. Les expérimentations sont réalisées sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Tous les animaux utilisés proviennent de l'animalerie de la Faculté de Médecine de Nantes. L'injection de vecteurs portant l'ADNc de l'UGT1A1 humaine nécessite l'utilisation de rats Gunn homozygotes (-/-), tandis que l'administration de vecteurs codant pour le gène rapporteur LacZ peut s'effectuer sur des Gunn hétérozygotes (+/-). Ils peuvent être différenciés dès la naissance, les homozygotes présentant une coloration jaune de la peau.

2. Techniques d'injections et de chirurgie

2.1. Chez le rat âgé de 1 ou 2 jours

Les injections de vecteurs chez le très jeune rat sont réalisées par la veine temporale. Pour cela, les animaux sont anesthésiés par hypothermie, puis sont placés sur une lampe à lumière froide afin de mettre en évidence la veine temporale. L'injection s'effectue alors grâce à un système composé d'une aiguille de 30 gauges fixée à l'extrémité d'un cathéter gradué, lui-même relié à une seringue comportant la solution virale. Les graduations du cathéter permettent de mesurer avec précision le volume injecté.

2.2. Chez le rat âgé de 2 semaines ou adulte

Les injections chez le rat âgé de 2 semaines ou plus sont réalisées après anesthésie gazeuse à l'isoflurane. L'administration de vecteurs chez les rats âgés de 2 semaines s'effectue par la veine porte. L'abdomen est ouvert par laparotomie médiane, puis le foie est déplacé pour permettre l'injection intra-portale. L'hémostase est réalisée à l'aide d'un coton-tige, puis une suture pariétale en deux plans est effectuée. Chez le rat adulte, les vecteurs viraux sont injectés par la veine porte, ou par la veine dorsale du pénis.

III. Détection de l'activité β -galactosidase

1. Coloration Xgal

Après biopsie ou sacrifice, l'organe ou la partie d'organe prélevé est maintenu dans une solution de formol 3.7% dilué dans du PBS 1X à pH 7.4 (v/v) - ou formaline - pendant quelques minutes, puis rincé dans une solution de NaCl à 0.9% (w/v). Le prélèvement est ensuite placé 24 heures dans une solution de 5-bromo 4-chloro 3-indolyl β -galactopyranoside (X-gal dilué dans du PBS, pH 8.1) à 37°C.

2. Mesure de l'activité Bgal sur foie total

Les échantillons de foie sont broyés dans un tampon composé de sucrose (250 mM), Tris-HCl (pH 7.4, 100 mM), EDTA 1 mM), supplémenté en inhibiteurs de protéases. Pour le dosage, 160µl de solution contenant du Tris-HCl (pH 7.4, 25 mM), NaCl (125 mM), MgCl₂ (2 mM), 2 β-mercaptoethanol (12 mM) and 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside (4-MUG, 0.3 mM) sont ajoutés à 40 µl d'homogénat de foie. Les échantillons sont mis à incuber 30min à 37°C, puis la réaction enzymatique est stoppée avec 50 µl d'acide trichloroacétique glacial. L'activité β-galactosidase activity est mesurée au fluorimètre en ajoutant 100µl d'échantillon à 1.9 ml de glycine carbonate. Les valeurs obtenues sont rapportées au nombre de protéines totales, déterminées au spectromètre (DO 750nm) grâce au kit de dosage DC de Bio-Rad ®.

IV. Immunohistochimie anti-β-galactosidase ou anti-GST-P

L'organe ou partie d'organe à étudier est maintenu dans de la formaline pendant au moins 24 heures, puis inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome puis déposées sur des lames porte-objet, et chauffées à 56°C pendant 6 heures. Avant toute coloration, les coupes sont déparaffinées à température ambiante. Tout d'abord, les lames passent dans deux bains successifs de toluène, 10 minutes puis 5 minutes. Ensuite, elles sont plongées dans des bains d'alcool de titre décroissant : 5 minutes dans de l'éthanol 100% puis 2 minutes dans de l'éthanol 70%. Enfin, un bain rapide dans de l'eau distillée puis un rinçage au PBS pH 7.4 permettent de terminer leur réhydratation.

Les coupes sont ensuite incubées avec de l'H₂O₂ à 3% v/v dans du PBS 1X pH7.4, afin d'inhiber les peroxydases endogènes, puis rincées rapidement à l'eau distillée et au PBS 1X pH7.4, et mises dans une chambre humide. Du sérum de cheval dilué au 1/100^e dans du PBS 1X pH7.4 est alors déposé pendant 20 minutes pour diminuer la fixation non spécifique des anticorps. Deux rinçage de 5 minutes dans du PBS pH 7.4 sont ensuite réalisés, puis les lames sont incubées avec un anticorps primaire dilué dans du PBS 1X pH7.4+ Tween 0.1% (v/v) + 3 % BSA (w/v). Il s'agit soit d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé soit contre la β galactosidase (dilué au 1/1000^e), soit contre la GST-P

placentaire humaine (dilué au 1/40^e). Les coupes sont mises à incuber sur la nuit à 4°C, puis subissent trois rinçages de 5 minutes dans du PBS 1X pH7.4. L'anticorps secondaire biotinylé, dilué au 1/50^e dans du PBS 1X pH7.4 (v/v) contenant du sérum à 2%, est ensuite ajouté. Après 30 minutes, les lames sont à nouveau rincées dans du PBS 1X pH7.4, puis un complexe d'avidine et de peroxydases est déposé pendant 30 minutes. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du PBS 1X pH7.4 puis la DAB (3,3' diaminobenzidine) est déposée quelques secondes. La coloration est ensuite stoppée dans de l'eau distillée. Les lames sont alors contre-colorées en hémalun, puis montées en milieu organique. Le comptage des cellules positives en β -galactosidase ou GST-P s'effectue sous microscope au grossissement x40, où chaque champ contient environ 300 hépatocytes.

V. Tests ELISA

La présence d'anticorps dirigés dans le sérum est détectée par test ELISA. Des plaques 96 puits sont coatées avec de la protéine β -galactosidase (20 μ g/ml) ou des microsomes humains contenant l'UGT1A1, et laissées sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les plaques sont rincées avec du PBS/Tween 20 (0.5% v/v), puis des dilutions en séries des séras à tester sont déposées (1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 pour l'UGT1A1, et 1/50, 1/1000, 1/5000 pour la β -galactosidase). Les plaques sont alors mises à incuber 1h30 à 37°C. Une IgG biotinylée anti-rat puis un complexe streptavidine/ peroxydase sont ajoutés. Le substrat de révélation est l'ABTS [2'-azino-di-(3-éthyl benzthiazoline-6-sulphonique)]. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, la densité optique est mesurée à 405 nm.

VI. PCR quantitatives

L'ADN génomique du foie total ou des zones disséquées est extrait par la technique classique de phénol/chloroforme. Dans une plaque 96 puits, 2 μ l de solutions d'ADN (100ng/ μ l pour le foie total ; 40 ng/ μ l pour les échantillons disséqués) sont ajoutés à 18 μ l de MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) par puits. Les plaques sont ensuite analysées par le système ABPrism 7000 (Applied Biosystems). Les conditions de réactions sont : 10min d'activation à 95°C, puis 40 cycles à 95°C pendant 15s suivis d'une minute à 60°C. Les valeurs obtenues sont normalisées grâce au gène HPRT de rat. Une courbe

standard est obtenue par dilution d'un plasmide LacZ ou UGT1A1 dans de l'ADN génomique de rat non injecté. Les séquences des primers utilisés sont :

HPRT (sens) : 5'-GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT-3'

HPRT (anti-sens) : 5'-GCCACATCAACAGGACTCTTGTAG-3'

LacZ (sens) : 5'-ATCAGGATATGTGGCGGATGA-3'

LacZ (anti-sens) : 5'-CTGATTTGTGT AGTCGGTTTATGCA-3'

UGT1A1 (sens) : 5'-TACACTGGAACCCGACCATC-3'

UGT1A1 (anti-sens) : 5'-AACAAGGGCATCATCACCA-3'

VII. Southern blot

Dix microgrammes d'ADN génomique extrait de foie de rats sont digérés par HindIII ou EcoNI, puis précipités et chargés sur un gel d'agarose à 0.8%. La migration s'effectue dans du tampon TAE1X (Tris-acetate-EDTA), à 32V pendant 16h. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane de nylon chargée positivement, en conditions neutres. La membrane est ensuite hybridée à 55°C avec une sonde marquée, puis révélée par le substrat CDP-star. La sonde utilisée est un fragment de 482pb obtenu par amplification du plasmide vecteur par qPCR, puis purifié et marqué à la phosphatase alcaline.

Les séquences des primers de qPCR utilisés pour la synthèse de la sonde sont :

MF-1 (sens) : 5'-AGTATCGGCGGAATTACAGCTGAGCGC-3'

MF-3 (anti-sens) : 5'-GCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTTAGG-3'

ANNEXE II - AUTRES ARTICLES

NGUYEN TH, AUBERT D, BELLODI-PRIVATO M, FLAGEUL M, PICHARD V, JAIDANE-ABDELGHANI Z, MYARA A, FERRY N. Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. Gene Ther. 2007. 1417:1270-7

SCHMITT F, DARIEL A, FLAGEUL M, PICHARD V, MYARA A, LAPLANCHE S, REMY S, ANEGON I, LABRUNE P, PODEVIN G, FERRY N, NGUYEN TH. Complete correction of Gunn rat with lentiviral vectors carrying miR142-3p target sequences to thwart immune response. (*soumis à Gastroenterology*)

BIBLIOGRAPHIE

- AGATI G**, FUSI F, PRATESI S, GALVAN P, et DONZELLI GP. (1998). Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy. *J Photochem Photobiol B* 47, 181-9.
- ALBA R**, BOSCH A, et CHILLON M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* 12 (Suppl 1), S18-27.
- ALLEN KJ**, CHEAH DM, WRIGHT PF, GAZEAS S, PETTIGREW-BUCK NE, DEAL YH, MERCER JF, et WILLIAMSON R. (2004). Liver cell transplantation leads to repopulation and functional correction in a mouse model of Wilson's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 ,1283-90.
- ANDREWS JL**, SHIRLEY PS, IVERSON WO, SHERER AD, MARKOVITS JE, KING L, LYONS RM, KALEKO M, CONNELLY S. (2002). Evaluation of the duration of human factor VIII expression in nonhuman primates after systemic delivery of an adenoviral vector. *Human Gene Therapy* 13, 1331-1336.
- ASKARI FK**, HITOMI Y, MAO M, et WILSON JM. Complete correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I following transient in vivo adenovirus-mediated expression of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *Gene Therapy* 3, 381-388.
- ATCHISON RW**, CASTO BC, et HAMMON WM. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754-756.
- AUBERT D**, MENORET S, CHIARI E, PICHARD V, DURAND S, TESSON L, MOULLIER P, ANEGON I, et FERRY N. (2002). Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat. *Molecular Therapy* 5, 388-396.
- BALLOT E**, DUCLOS-VALLÉE JC, et JOHANET C. (2003). Relations entre foie et immunité. *Encycl Méd Chir, Hépatologie*, 7-006-A-10
- BELL P**, WANG L, LEBHERZ C, FLIEDER DB, BOVE MS, WU D, GAO GP, WILSON JM, et Wivel NA (2005) No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther*. 12(2):299-306
- BELL P**, MOSCIONI AD, McCARTER RJ, WU D, GAO G, HOANG A, SANMIGUEL JC, et al. (2006). Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Molecular Therapy* 14, 34-44.
- BELLODI-PRIVATO M**, AUBERT D, PICHARD V, MYARA A, TRIVIN F, et FERRY N. (2005). Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology* 42, 431-438.
- BLAESE RM**, CULVER KW, MILLER AD, CARTER CS, FLEISHER T, CLERICI M, SHEARER G, et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID : initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-80
- BOWEN DG**, MCCAUGHAN GW, et BERTOLINO P. (2005). Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends in Immunology* 26, 512-517.
- BRAET F**, et WISSE E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology* 1, 1.
- BRANCHEREAU S**, FERRY N, MYARA A, SATO H, KOWAI O, TRIVIN F, HOUSSIN D, DANOS O, et HEARD J. (1993). Correction of bilirubin glucuronyl transferase in Gunn rats by gene transfer in the liver using retroviral vectors. *Chirurgie ; Mémoires De l'Académie De Chirurgie* 119, 642-648.
- BRANTLY ML**, SPENCER LT, HUMPHRIES M, CONLON TJ, SPENCER CT, POIRIER A, GARLINGTON W, et al. (2006). Phase I trial of intramuscular injection of a

recombinant adeno-associated virus serotype 2 alphas-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Human Gene Therapy* 17, 1177-1186

BRANTLY ML, CHULAY JD, WANG L, MUELLER C, HUMPHRIES M, SPENCER LT, ROUHANI F, et al. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Epub ahead of print]

BROWN MS, Goldstein JL, Havel RJ, et Steinberg D.(1994) Gene therapy for cholesterol. *Nat Genet.* 7(3):349-50.

BROWN BD, VENNERI MA, ZINGALE A, SERGI SERGI L, et NALDINI L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nature Medicine* 12, 585-591.

BROWN BD, CANTORE A, ANNONI A, SERGI LS, LOMBARDO A, DELLA VALLE P, D'ANGELO A, et NALDINI L. (2007). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 110, 4144-4152.

BRUNETTI-PIERRI N, et LEE B. (2005). Gene therapy for inborn errors of liver metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* 86, 13-24.

BÜNING H, PERABO L, COUTELLE O, QUADT-HUMME S, et HALLEK M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The Journal of Gene Medicine* 10, 717-733.

CAVAZZANA-CALVO M, HACEIN-BEY S, DE SAINT BASILE G, GROSS F, YVON E, NUSBAUM P, SELZ F, et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 669-672.

CHOWDHURY JR, GROSSMAN M, GUPTA S, CHOWDHURY NR, BAKER JR, et WILSON JM. (1991). Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 254, 1802-1805.

CHOWDHURY NR, HAYS RM, BOMMINENI VR, FRANKI N, CHOWDHURY JR, WU CH, et WU GY. (1996). Microtubular disruption prolongs the expression of human bilirubin-uridinediphosphoglucuronate-glucuronosyltransferase-1 gene transferred into Gunn rat livers. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 2341-2346.

CHUAH MK, SCHIEDNER G, THORREZ L, BROWN B, JOHNSTON M, GILLIJS V, HERTEL S, et al. (2003). Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dog models of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood* 101, 1734-1743.

CHUAH MK, COLLEN D, et VANDENDRIESSCHE T. (2004). Preclinical and clinical gene therapy for haemophilia. *Haemophilia* 10, (Suppl 4) : 119-125.

CRIGLER JF, et NAJJAR VA (1952). Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 10, 169-180.

CUNNINGHAM SC, DANE AP, SPINOULAS A, LOGAN GJ, et ALEXANDER IE. (2008). Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Molecular Therapy* 16, 1081-1088.

DALY TM, OKUYAMA T, VOGLER C, HASKINS ME, MUZYCZKA N, et SANDS MS. (1999). Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged beta-glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Human Gene Therapy* 10, 85-94.

DALY TM, OHLEMILLER KK, ROBERTS MS, VOGLER CA, et SANDS MS. (2001). Prevention of systemic clinical disease in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene transfer. *Gene Therapy* 8, 1291-1298.

DARIEL A, NGUYEN TH, PICHARD V, SCHMITT F, AUBERT D, FERRY N, et PODEVIN G. (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *Journal of Pediatric Surgery* 44, 517-522.

DAVIDOFF AM, NG CY, ZHOU J, SPENCE Y, et NATHWANI AC (2003). Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood*. 15;102(2):480-8

DAYA S, et BERNIS KI. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 583-593.

DE VREE JM, OTTENHOFF R, BOSMA PJ, SMITH AJ, ATEN J, et OUDE ELFERINK RP. (2000). Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 119, 1720-1730.

DONSANTE A, VOGLER C, MUZYCZKA N, CRAWFORD JM, BARKER J, FLOTTE T, CAMPBELL-THOMPSON M, DALY T, et SANDS MS (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* 8(17):1343-6.

DONSANTE A, MILLER DG, LI Y, VOGLER C, BRUNT EM, RUSSELL DW, et SANDS MS. (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317 : 477.

DORMOND E, PERRIER M, et KAMEN A. (2009) Identification of critical infection parameters to control helper-dependent adenoviral vector production. *J Biotechnol.* 15;142(2):142-50.

DROPULIC B, et JUNE CH. (2006) Gene-based immunotherapy for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Human Gene Therapy* 17, 577-588.

EHRHARDT A, XU H, DILLOW AM, BELLINGER DA, NICHOLS TC, et KAY MA. (2003). A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia. *Blood* 102, 2403-2411.

ERBACHER P, BOUSSER MT, RAIMOND J, MONSIGNY M, MIDOUX P, et ROCHE AC. (1996). Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Human Gene Therapy* 7, 721-729.

ERLES K, SEBÖKOVA P, et SCHLEHOFER JR. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *Journal of Medical Virology* 59, 406-411.

FAIRBANKS KD, et TAVILL AS. (2008). Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *J Gastroenterol.* 103, 2136-41.

FERRY N, et HEARD JM. (1998). Liver-directed gene transfer vectors. *Human Gene Therapy* 9, 1975-1981.

FERRY N. (1999). Thérapie génique des maladies héréditaires du foie. *Annales de l'Institut Pasteur.* 10, 339-349.

FERRY N. (2003). Gene therapy and liver diseases. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 27, 288-290.

FLAGEUL M, AUBERT D, PICHARD V, NGUYEN TH, NOWROUZI A, SCHMIDT M, et FERRY N. (2009). Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *The Journal of Gene Medicine* 11, 689-696.

FLOTTE TR, ZEITLIN PL, REYNOLDS TC, HEALD AE, PEDERSEN P, BECK S, CONRAD CK, et al. (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. *Human Gene Therapy* 14, 1079-1088.

FOLLENZI A, BATTAGLIA M, LOMBARDO A, ANNONI A, RONCAROLO MG, et NALDINI L. (2004). Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 103, 3700-3709.

FOX IJ, CHOWDHURY JR, KAUFMAN SS, GOERTZEN TC, CHOWDHURY NR, WARKENTIN PI, DORKO K, SAUTER BV, et STROM SC. (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine* 338, 1422-1426.

FRANCAVILLA A, ZENG Q, POLIMENO L, CARR BI, SUN D, PORTER KA, VAN THIEL DH, et STARZL TE (1994). Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* 19(1):210-6.

FREGONESE L, et STOLK J. (2008). Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3, 16.

FU H, MUENZER J, SAMULSKI RJ, BREESE G, SIFFORD J, ZENG X, et McCARTY DM.(2003).Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Molecular Therapy* 8, 911-917.

GALLO-PENN AM, SHIRLEY PS, ANDREWS JL, TINLIN S, WEBSTER S, CAMERON C, HOUGH C, et al. (2001). Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 97, 107-113.

GAO GP, LU Y, SUN X, JOHNSTON J, CALCEDO R, GRANT R, et WILSON JM. (2006). High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *Journal of Virology* 80, 6192-6194.

GAO G, WANG Q, CALCEDO R, MAYS L, BELL P, WANG L, VANDENBERGHE LH, et al. (2009).Adeno-associated virus-mediated gene transfer to nonhuman primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses. *Human Gene Therapy* 20, 930-942.

GASMI M, BRANDON EP, HERZOG CD, WILSON A, BISHOP KM, HOFER EK, CUNNINGHAM JJ, et al. (2007). AAV2-mediated delivery of human neuritin to the rat nigrostriatal system: long-term efficacy and tolerability of CERE-120 for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 27(1):67-76.

GHOSH A, ALLAMARVDASHT M, PAN CJ, SUN MS, MANSFIELD BC, BYRNE BJ, et CHOU JY. (2006). Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Therapy* 13, 321-329.

GHOSH A, YUE Y, LONG C, BOSTICK B, et DUAN D. (2007). Efficient whole-body transduction with trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Molecular Therapy* 15, 750-755.

GIROD A, RIED M, WOBUS C, LAHM H, LEIKE K, KLEINSCHMIDT J, DELEAGE G, et HALLEK M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nature Medicine* 5, 1052-1056.

GONÇALVES MA. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal* 2, 43.

GOURNAY J, AUVIGNE I, PICHARD V, LIGEZA C, BRALET M-P, et FERRY N. (2002). In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Laboratory Investigation* 82, 781-788.

GRIEGER JC, et SAMULSKI RJ. (2005). Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *Journal of Virology* 79, 9933-9944.

GRIMM D, PANDEY K, NAKAI H, STORM TA, et KAY MA.(2006). Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *Journal of Virology* 80, 426-439.

- GROOS J, BANNASCH P, SCHWARZ M, et KOPP-SCHNEIDER A.** (2007). Comparison of mode of action of four hepatocarcinogens: a model-based approach. *Toxicological Sciences* 99, 446-454.
- GROSSMAN M, RAPER SE, et WILSON JM.** (1992). Transplantation of genetically modified autologous hepatocytes into nonhuman primates: feasibility and short-term toxicity. *Human Gene Therapy* 3, 501-510.
- GROSSMAN M, WILSON JM, et RAPER SE** (1993). A novel approach for introducing hepatocytes into the portal circulation. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 121, 472-478.
- GROSSMAN M, RAPER SE, KOZARSKY K, STEIN EA, ENGELHARDT JF, MULLER D, LUPIEN PJ, et WILSON JM.** (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genetics* 6, 335-341.
- GROSSMAN M, RADER DJ, MULLER DW, KOLANSKY DM, KOZARSKY K, CLARK BJ 3RD, STEIN EA, et al.** (1995). A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med.* 1(11):1148-54.
- GUIDOTTI JE, BRÉGERIE O, ROBERT A, DEBEY P, BRECHOT C, et DESDOUETS C** (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* 278(21):19095-101.
- GUNN CK** (1938). Hereditary acholuric jaundice in a new mutant strain of rat. *Journal of Heredity.* 29, 137-139.
- GUPTA S.** (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol.* 10(3):161-71.
- HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, MCCORMACK MP, WULFFRAAT N, LEBOULCH P, LIM A, OSBORNE CS, et al.** (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644):415-9.
- HACEIN-BEY-ABINA S, GARRIGUE A, WANG GP, SOULIER J, LIM A, MORILLON E, CLAPPIER E, et al.** (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation* 118, 3132-3142.
- HADJIOLOV N, BITSCH A, et NEUMANN HG.** (1995). Early initiating and promoting effects in 2-AAF-induced rat liver carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Cancer Letters* 98, 39-46.
- HAKKARAINEN T, et HEMMINKI A.** (2005). Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes. *Gene Ther Mol Biol* 9, 153-168.
- HAUCK B, CHEN L, et XIAO W.** (2003) Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors." *Molecular Therapy* 7, 419-425.
- HIGGINS GM, et ANDERSON RM.** (1931). Experimental pathology of the liver, 1:Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12:186-202.
- ILAN Y, ATTAVAR P, TAKAHASHI M, DAVIDSON A, HORWITZ MS, GUIDA J, CHOWDHURY NR, et CHOWDHURY JR.** (1996). Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats. *The Journal of Clinical Investigation* 98, 2640-2647.
- ILAN Y, SAUTER B, CHOWDHURY NR, REDDY BV, THUMMALA NR, DROGUETT G, DAVIDSON A, OTT M, HORWITZ MS, et CHOWDHURY JR.** (1998). Oral tolerization to adenoviral proteins permits repeated adenovirus-mediated gene therapy in rats with pre-existing immunity to adenoviruses. *Hepatology* 27, 1368-1376.

- INAGAKI K, PIAO C, KOTCHEY NM, WU X, et NAKAI H.** (2008). Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *Journal of Virology* 82, 9513-9524.
- JANSEN, P L.** (1999). Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *European Journal of Pediatrics* 158 (Suppl 2), S89-94.
- JIA Z, DANKÓ I.** (2005). Long-term correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat by repeated intravenous delivery of naked plasmid DNA into muscle. *Molecular Therapy* 12, 860-866.
- JIANG H, PIERCE GF, OZELO MC, DE PAULA EV, VARGAS JA, SMITH P, SOMMER J, et al.** (2006). Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Molecular Therapy* 14, 452-455.
- KAWAKAMI S, MUNAKATA C, FUMOTO S, YAMASHITA F, et HASHIDA M.** (2000). Targeted delivery of prostaglandin E1 to hepatocytes using galactosylated liposomes. *Journal of Drug Targeting* 8, 137-142.
- KAWASHITA Y, GUHA C, MOITRA R, WANG X, FOX IJ, ROY-CHOWDHURY J, et ROY-CHOWDHURY N.** (2008). Hepatic repopulation with stably transduced conditionally immortalized hepatocytes in the Gunn rat. *Journal of Hepatology* 49, 99-106.
- KAY MA, MANNO CS, RAGNI MV, LARSON PJ, COUTO LB, McCLELLAND A, GLADER B. et al.** (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics* 24, 257-261.
- KIWAKI K, KANEGAE Y, SAITO I, KOMAKI S, NAKAMURA K, MIYAZAKI JI, ENDO F, et MATSUDA I.** (1996). Correction of ornithine transcarbamylase deficiency in adult spf (ash) mice and in OTC-deficient human hepatocytes with recombinant adenoviruses bearing the CAG promoter. *Human Gene Therapy* 7, 821-830.
- KLINMAN DM, KLASCHIK S, SATO T, et TROSS D** (2009). CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 28;61(3):248-55.
- KOCHANIEK S, CLEMENS PR, MITANI K, CHEN HH, CHAN S, et CASKEY CT.** (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11;93(12):5731-6.
- KOEBERL DD, PINTO C, SUN B, LI S, KOZINK DM, BENJAMIN DK JR, DEMASTER AK, et al.** (2008). AAV vector-mediated reversal of hypoglycemia in canine and murine glycogen storage disease type Ia. *Molecular Therapy* 16, 665-672.
- KORDOWER JH, HERZOG CD, DASS B, BAKAY RA, STANSELL J 3RD, et GASMI M, BARTUS RT.** (2006) Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol.* 60(6):706-15.
- KOTIN RM, SINISCALCO M, SAMULSKI RJ, ZHU XD, HUNTER L, LAUGHLIN CA, McLAUGHLIN S, MUZYCZKA N, ROCCHI M, et BERNIS KI.** (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2211-2215.
- KÜGLER S, HAHNEWALD R, GARRIDO M, et REISS J.** (2007). Long-term rescue of a lethal inherited disease by adeno-associated virus-mediated gene transfer in a mouse model of molybdenum-cofactor deficiency. *American Journal of Human Genetics* 80, 291-297.
- KWON I, et SCHAFFER DV.** (2008). Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. *Pharmaceutical Research* 25, 489-499.
- LABRUNE P.** (2004). La maladie de Crigler-Najjar. *Encyclopédie Orphanet.*

LAI Y, YUE Y, LIU M, GHOSH A, ENGELHARDT JF, CHAMBERLAIN JS, et DUAN D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nature Biotechnology* 23, 1435-1439.

LEBHERZ C, GAO G, LOUBOUTIN JP, MILLAR J, RADER D, et WILSON JM. (2004). Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *The Journal of Gene Medicine* 6, 663-672.

LE MEUR G, STIEGER K, SMITH AJ, WEBER M, DESCHAMPS JY, NIVARD D, MENDES-MADEIRA A, et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Therapy* 14, 292-303.

LEVINE BL, HUMEAU LM, BOYER J, MacGREGOR RR, REBELLO T, LU X, BINDER GK et al. (2006). Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17372-17377.

LI Q, MURPHREE SS, WILLER SS, BOLLI R, et FRENCH BA. (1998). Gene therapy with bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type 1." *Human Gene Therapy* 9, 497-505.

LINGAM S, WILSON J, NAZER H, et MOWAT AP. (1987). Neurological abnormalities in Wilson's disease are reversible. *Neuropediatrics* 18, 11-12.

LOEB JE, CORDIER WS, HARRIS ME, WEITZMAN MD, et HOPE TJ (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.* 20;10(14):2295-305.

LONNING SM, FORD CA, TAYLOR KM, et al. Influence of gender-specific hormones on adeno-associated virus vector gene transfer and expression (2005). [abstract]. *Mol Ther.* 5: S2.

LÖSER P, JENNINGS GS, STRAUSS M, et SANDIG V. (1998). Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *Journal of Virology* 72, 180-190.

LU Y. (2004). Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells and Development* 13, 133-145.

LU Y, CHOI YK, CAMPBELL-THOMPSON M, LI C, TANG Q, CRAWFORD JM, FLOTTE TR, et SONG S. (2006). Therapeutic level of functional human alpha 1 antitrypsin (hAAT) secreted from murine muscle transduced by adeno-associated virus (rAAV1) vector. *The Journal of Gene Medicine* 8, 730-735.

MAGUIRE AM, HIGH KA, AURICCHIO A, WRIGHT JF, PIERCE EA, TESTA F, MINGOZZI F, BENNICELLI JL, et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374(9701):1597-605.

MALHI H, IRANI AN, VOLENBERG I, SCHILSKY ML, et GUPTA S. (2002). Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 122, 438-447.

MALLET VO, REGIMBEAU JM, MITCHELL C, GUIDOTTI JE, SOUBRANE O, et GILGENKRANTZ H. (2002). [Liver repopulation: the selective advantage concept]. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 26, 480-485.

MANNO CS, CHEW AJ, HUTCHISON S, LARSON PJ, HERZOG RW, ARRUDA VR, TAI SJ, et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B." *Blood* 101, 2963-2972.

MANNO CS, PIERCE GF, ARRUDA VR, GLADER B, RAGNI M, RASKO JJ, et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine* 12, 342-347.

MARKS WJ JR, OSTREM JL, VERHAGEN L, STARR PA, LARSON PS, BAKAY RA, TAYLOR R, et al. (2008). Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.* 7(5):400-8.

MASUREL-PAULET A, POGGI-BACH J, ROLLAND MO, BERNARD O, GUFFON N, DOBBELAERE D, SARLES J, DE BAULNY HO, et TOUATI G. (2008). NTBC treatment in tyrosinaemia type I: long-term outcome in French patients. *J Inherit Metab Dis.* 31(1):81-7.

MCCARTY DM, MONAHAN PE, et SAMULSKI RJ. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Therapy* 8, 1248-1254.

MCPHEE SW, JANSON CG, LI C, SAMULSKI RJ, CAMP AS, FRANCIS J, SHERA D, et al. (2006). Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *The Journal of Gene Medicine* 8, 577-588.

MERLE U, ENCKE J, TUMA S, VOLKMANN M, NALDINI L, et STREMMEL W. (2006). Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats: an animal model for Wilson disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 41, 974-982.

MERTEN OW, GÉNY-FIAMMA C, DOUAR AM. (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Therapy* 12 (Suppl 1), S51-61.

MIAN A, McCORMACK WM JR, MANE V, KLEPPE S, NG P, FINEGOLD M, O'BRIEN WE, RODGERS JR, BEAUDET AL, et LEE B. (2004). Long-term correction of ornithine transcarbamylase deficiency by WPRE-mediated overexpression using a helper-dependent adenovirus. *Molecular Therapy* 10, 492-499.

MICHALOPOULOS GK, et DeFRANCES MC. (1997). Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.

MICHALOPOULOS GK. (2007). Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology* 213, 286-300.

MINGOZZI F, HASBROUCK NC, BASNER-TSCHAKARJAN E, EDMONSON SA, HUI DJ, SABATINO DE, ZHOU S, et al. (2007). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 110, 2334-2341.

MIRANDA PS, et BOSMA PJ. (2009). Towards liver-directed gene therapy for Crigler-Najjar syndrome. *Current Gene Therapy* 9, 72-82.

MORRAL N, O'NEAL W, RICE K, LELAND M, KAPLAN J, PIEDRA PA, ZHOU H, et al. (1999). Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12816-12821.

MOSKALENKO M, CHEN L, van ROEY M, DONAHUE BA, SNYDER RO, McARTHUR JG, et PATEL SD. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *Journal of Virology* 74, 1761-1766.

MOUNT JD, HERZOG RW, TILLSON DM, GOODMAN SA, ROBINSON N, McCLELAND ML, BELLINGER D, et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 99, 2670-2676.

MUELLER C, et FLOTTE TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. (2008). *Gene Therapy* 15, 858-863.

MULLIGAN RC. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.

MURPHY SL et HIGH KA. (2008). Gene therapy for haemophilia. *British Journal of Haematology* 140, 479-487.

NAKAI H, STORM TA, et KAY MA. (2000). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *Journal of Virology* 74, 9451-9463.

NATHWANI AC, DAVIDOFF AM, HANAWA H, HU Y, HOFFER FA, NIKANOROV A, SLAUGHTER C, et al. (2002). Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 100, 1662-1669 ;

NATHWANI AC, COCHRANE M, McINTOSH J, NG CY, ZHOU J, GRAY JT, et DAVIDOFF AM. (2009). Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy* 16, 60-69.

NGUYEN TH, BELLODI-PRIVATO M, AUBERT D, PICHARD V, MYARA A, TRONO D, et FERRY N. (2005). Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Molecular Therapy* 12, 852-859.

NGUYEN TH, AUBERT D, BELLODI-PRIVATO M, FLAGEUL M, PICHARD V, JAIDANE-ABDELGHANI Z, MYARA A, et FERRY N. (2007). Critical assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene Therapy* 14, 1270-1277.

NGUYEN TH, MAINOT S, LAINAS P, GROUYER-PICARD MT, FRANCO F, DAGHER I, et WEBER A. (2009). Ex vivo liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases: advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors. *Current Gene Therapy* 9, 136-149.

NINOMIYA M, HARADA N, SHIOTANI S, HIROSHIGE S, MINAGAWA R, SOEJIMA Y, SUEHIRO T, NISHIZAKI T, SHIMADA M, et SUGIMACHI K (2003). Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 contribute to regeneration of small-for-size liver graft immediately after transplantation. *Transpl Int.* 16(11):814-9.

OVERTURF K, AL-DHALIMY M, OU CN, FINEGOLD M, TANGUAY R, LIEBER A, KAY M, et GROMPE M. (1997). Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther.* 20 , 513-21.

OVERTURF K, AL-DHALIMY M, MANNING K, OU CN, FINEGOLD M, et GROMPE M. (1998). Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Human Gene Therapy* 9, 295-304.

PAGÈS JC, et BRU T. (2004). Toolbox for retrovectorologists. *The Journal of Gene Medicine* 6 (Suppl 1), S67-82.

PATHAK A, VYAS SP, GUPTA KC. (2008). Nano-vectors for efficient liver specific gene transfer. *International Journal of Nanomedicine* 3, 31-49.

PENAUD-BUDLOO M, LE GUINER C, NOWROUZI A, TOROMANOFF A, CHEREL Y, CHENUAUD P, SCHMIDT M, et al. (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *Journal of Virology* 82, 7875-7885.

PETIT M. (2008). Aspects moléculaires des maladies rares du métabolisme hépatique à propos de la maladie de Crigler-Najjar. *Th. Univ. , Nantes*

PIEN GC, BASNER-TSCHAKARJAN E, HUI DJ, MENTLIK AN, FINN JD, HASBROUCK NC, ZHOU S, et al. (2009) Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors *J Clin Invest.* 119(6):1688-95

PIRES PW, FURTADO KS, JUSTULLIN LA JR, RODRIGUES MA, FELISBINO SL, et BARBISAN LF. (2008). Chronic ethanol intake promotes double glutathione S-transferase/transforming growth factor- α -positive hepatocellular lesions in male Wistar rats. *Cancer Science* 99, 221-228.

PONNAZHAGAN S, ERIKSON D, KEARNS WG, ZHOU SZ, NAHREINI P, WANG XS, et SRIVASTAVA A. (1997). Lack of site-specific integration of the recombinant adeno-associated virus 2 genomes in human cells. *Human Gene Therapy* 8, 275-284.

PONNAZHAGAN S, MAHENDRA G, KUMAR S, THOMPSON JA, et CASTILLAS M JR. (2002). Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *Journal of Virology* 76, 12900-12907.

POWELL JS, RAGNI MV, WHITE GC, LUSHER JM, HILLMAN-WISEMAN C, MOON TE, COLE V, et al. (2003). Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion. *Blood* 102, 2038-2045.

RAPER SE, WILSON JM, YUDKOFF M, ROBINSON MB, YE X, et BATSHAW ML. (1998). Developing adenoviral-mediated in vivo gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21 (Suppl 1), 119-137.

RAPER SE, YUDKOFF M, CHIRMULE N, GAO GP, NUNES F, HASKAL ZJ, FURTH EE, et al. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Human Gene Therapy* 13, 163-175.

RAPER SE, CHIRMULE N, LEE FS, WIVEL NA, BAGG A, GAO GP, WILSON JM, et BATSHAW ML. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism* 80, 148-158.

REDDY PS, SAKHUJA K, GANESH S, YANG L, KAYDA D, BRANN T, PATTISON S, et al. (2002). Sustained human factor VIII expression in hemophilia A mice following systemic delivery of a gutless adenoviral vector. *Molecular Therapy* 5, 63-73.

REYES L, ALEXANDER JJ, SONG S, et al. (2001) The effect of sex hormones on rAAV-mediated gene therapy in female Pah^{enu2} mice, an animal model for PKU [abstract]. *Mol Ther.* 3: S232-S233.

ROLLING F, LE MEUR G, STIEGER K, SMITH AJ, WEBER M, DESCHAMPS JY, NIVARD D, et al. (2006). Gene therapeutic prospects in early onset of severe retinal dystrophy: restoration of vision in RPE65 Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Bulletin Et Mémoires De l'Académie Royale De Médecine De Belgique* 161, 497-508; discussion 508-509.

ROTH DA, TAWA NE JR, O'BRIEN JM, TRECO DA, et SELDEN RF (2001). Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 7;344(23):1735-42.

RUSSELL DW, et KAY MA. (1999) Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood.* 1;94(3):864-74.

SAKURAI H, SAKURAI F, KAWABATA K, SASAKI T, KOIZUMI N, HUANG H, TASHIRO K, KURACHI S, NAKAGAWA S, et MIZUGUCHI H. (2007). *Journal of Controlled Release* 117, 430-437.

SAMULSKI RJ, ZHU X, XIAO X, BROOK JD, HOUSMAN DE, EPSTEIN N, et HUNTER LA. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal* 10, 3941-3950.

SCALLAN CD, JIANG H, LIU T, PATARROYO-WHITE S, SOMMER JM, ZHOU S, COUTO LB, et PIERCE GF. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810-1817.

- SCHAMBACH A**, et **BAUM C**. (2008). Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Current Gene Therapy* 8, 474-482.
- SCHAUER R**, **STANGL M**, **LANG T**, **ZIMMERMANN A**, **CHOUKER A**, **GERBES AL**, **SCHILDBERG FW**, et **RAU HG**. (2003). Treatment of Crigler-Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation. *Journal of Pediatric Surgery* 38, 1227-1231.
- SCHMIDT M**, **SCHWARZWAELDER K**, **BARTHOLOMAE C**, **ZAOUI K**, **BALL C**, **PILZ I**, **BRAUN S**, **GLIMM H**, et **VON KALLE C**. (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nature Methods* 4, 1051-1057.
- SCHNELL MA**, **ZHANG Y**, **TAZELAAR J**, **GAO GP**, **YU QC**, **QIAN R**, **CHEN SJ**, et al. (2001). Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Molecular Therapy* 3, 708-722.
- SCHULTZ BR**, et **CHAMBERLAIN JS**. (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Molecular Therapy* 16, 1189-1199.
- SEPPEN J**, **TADA K**, **OTTENHOFF R**, **SENGUPTA K**, **CHOWDHURY NR**, **CHOWDHURY JR**, **BOSMA PJ**, et **OUDE ELFERINK RP**. Transplantation of Gunn rats with autologous fibroblasts expressing bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: correction of genetic deficiency and tumor formation. *Hum Gene Ther.* 1;8(1):27-36.
- SEPPEN J**, **VAN TIL NP**, **VAN DER RIJT R**, **HIRALALL JK**, **KUNNE C**, et **ELFERINK RP**. (2006a). Immune response to lentiviral bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene transfer in fetal and neonatal rats. *Gene Therapy* 13, 672-677.
- SEPPEN J**, **BAKKER C**, **DE JONG B**, **KUNNE C**, **VAN DEN OEVER K**, **VANDENBERGHE K**, **DE WAART R**, **TWISK J**, et **BOSMA P**. (2006b). Adeno-associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Molecular Therapy* 13, 1085-1092.
- SIMÕES S**, **SLEPUSHKIN V**, **PIRES P**, **GASPAR R**, **PEDROSO DE LIMA MC**, et **DÜZGÜNES N**. (2000). Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1463, 459-469.
- SMEDSRØD B**, **DE BLESER PJ**, **BRAET F**, **LOVISETTI P**, **VANDERKERKEN K**, **WISSE E**, et **GEERTS A**. (1994). Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35, 1509-1516.
- SMITH TA**, **MEHAFFEY MG**, **KAYDA DB**, **SAUNDERS JM**, **YEI S**, **TRAPNELL BC**, **MCCLELLAND A**, et **KALEKO M**. (1993). Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. *Nature Genetics* 5, 397-402.
- SNYDER RO**, **MIAO CH**, **PATIJN GA**, **SPRATT SK**, **DANOS O**, **NAGY D**, **GOWN AM**, et al. (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nature Genetics* 16, 270-276.
- SNYDER RO**. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *The Journal of Gene Medicine* 1, 166-175.
- SOLT DB**, **MEDLINE A**, et **FARBER E** (1977). Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol.* 88(3):595-618
- SONG S**, **EMBURY J**, **LAIPIS PJ**, **BERNS KI**, **CRAWFORD JM**, et **FLOTTE TR**. (2001). Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Therapy* 8, 1299-1306.
- STÖCKER E**, **WULLSTEIN HK**, et **BRÄU G**. (1973). [Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after

continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl)]. *Virchows Archiv. B: Cell Pathology* 14, 93-103.

SUMMERFORD C, et **SAMULSKI RJ**. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72 , 1438-45.

SUN MS, **PAN CJ**, **SHIEH JJ**, **GHOSH A**, **CHEN LY**, **MANSFIELD BC**, **WARD JM**, et al. (2002). Sustained hepatic and renal glucose-6-phosphatase expression corrects glycogen storage disease type Ia in mice. *Hum Mol Genet.* 1;11(18):2155-64.

TADA K, **N R CHOWDHURY**, **D NEUFELD**, **P J BOSMA**, **M HEARD**, **V R PRASAD**, et **J R CHOWDHURY**. Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo. *Liver Transplantation and Surgery* 4, 78-88.

TAKAHASHI M, **ILAN Y**, **CHOWDHURY NR**, **GUIDA J**, **HORWITZ M**, et **CHOWDHURY JR**. (1996). Long term correction of bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase deficiency in Gunn rats by administration of a recombinant adenovirus during the neonatal period. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 26536-26542.

TAUB R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, 836-847.

TERADA K, **NAKAKO T**, **YANG XL**, **IIDA M**, **AIBA N**, **MINAMIYA Y**, **NAKAI M**, **SAKAKI T**, **MIURA N**, et **SUGIYAMA T**. (1998). Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA." *The Journal of Biological Chemistry* 273, 1815-1820.

TESSITORE A, **FAELLA A**, **O'MALLEY T**, **COTUGNO G**, **DORIA M**, **KUNIEDA T**, **MATARESE G**, **HASKINS M**, et **AURICCHIO A**. (2008). Biochemical, pathological, and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Molecular Therapy* 16, 30-37.

THUMMALA NR, **GHOSH SS**, **LEE SW**, **REDDY B**, **DAVIDSON A**, **HORWITZ MS**, **CHOWDHURY JR**, et **CHOWDHURY NR**. (2002). A non-immunogenic adenoviral vector, coexpressing CTLA4Ig and bilirubin-uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase permits long-term, repeatable transgene expression in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome." *Gene Therapy* 9, 981-990.

TOIETTA G, **MANE VP**, **NORONA WS**, **FINEGOLD MJ**, **NG P**, **MCDONAGH AF**, **BEAUDET AL**, et **LEE B**. (2005). Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3930-3935.

VAESSEN SF, **VELDMAN RJ**, **COMIJN EM**, **SNAPPER J**, **SIERTS JA**, **VAN DEN OEVER K**, **BEATTIE SG**, **TWISK J**, et **KUIVENHOVEN JA**. (2009). AAV gene therapy as a means to increase apolipoprotein (Apo) A-I and high-density lipoprotein-cholesterol levels: correction of murine ApoA-I deficiency. *The Journal of Gene Medicine* 11, 697-707.

VANDENDRIESSCHE T, **THORREZ L**, **ACOSTA-SANCHEZ A**, **PETRUS I**, **WANG L**, **MA L**, **DE WAELE L**, et al. (2007). Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 16-24.

VAN DER WEGEN P, **LOUWEN R**, **IMAM AM**, **BUIJS-OFFERMAN RM**, **SINAASAPPEL M**, **GROSVELD F**, et **SCHOLTE BJ**. (2006). Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Molecular Therapy* 13, 374-381.

VAN THIEL DH, **GAVALER JS**, **KAM I**, **FRANCAVILLA A**, **POLIMENO L**, **SCHADE RR**, **SMITH J**, **DIVEN W**, **PENKROT RJ**, et **STARZL TE** (1987). Rapid

growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* 93(6):1414-9.

VASILEVA A, et JESSBERGER R. (2005). Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nature Reviews. Microbiology* 3, 837-847.

VIRAG T, CECCHINI S, et KOTIN RM. (2009). Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy. *Human Gene Therapy* 20, 807-817.

WANG Z, ZHU T, QIAO C, ZHOU L, WANG B, ZHANG J, CHEN C, LI J, et XIAO X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biotechnology* 23, 321-328.

WANG J, XIE J, LU H, CHEN L, HAUCK B, SAMULSKI RJ, et XIAO W. (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13104-13109.

WASUNGU L, et HOEKSTRA D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *Journal of Controlled Release* 116, 255-264.

WEATHERALL D. (1994). Heroic gene surgery. *Nat Genet.* 6(4):325-6.

WILKE M, BIJMA A, TIMMERS-REKER AJ, SCHOLTE BJ, et SINAASAPPEL M. (1997). Complementation of the genetic defect in Gunn rat hepatocytes in vitro by highly efficient gene transfer with cationic liposomes. *Gene Therapy* 4, 1305-1312.

WILSON JM, GROSSMAN M, RAPER SE, BAKER JR, NEWTON RS, et THOENE JG. (1992). Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Human Gene Therapy* 3, 179-222.

WILSON JM. (2009). Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 96, 151-157.

WOOD AM, et STOCKLEY RA. (2007). Alpha one antitrypsin deficiency: from gene to treatment. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 74, 481-492.

WU GY, et WU CH. (1988). Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 14621-14624.

WU JC, HUANG CC, JENG LB, et CHU NS. (2000). Correlation of neurological manifestations and MR images in a patient with Wilson's disease after liver transplantation. *Acta Neurologica Scandinavica* 102, 135-139.

WU Z, ASOKAN A, et SAMULSKI RJ. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy*: 14, 316-327.

WU J, Zhao W, Zhong L, Han Z, Li B, Ma W, Weigel-Kelley KA, Warrington KH, et Srivastava A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Human Gene Therapy* 18, 171-182.

YANG CC, XIAO X, ZHU X, ANSARDI DC, EPSTEIN ND, FREY MR, et MATERA AG, SAMULSKI RJ. (1997) Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol.* 71(12):9231-47.

YE X, ROBINSON MB, BATSHAW ML, FURTH EE, SMITH I, et WILSON JM. (1996) Prolonged metabolic correction in adult ornithine transcarbamylase-deficient mice with adenoviral vectors. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 3639-3646.

YE, X, ROBINSON MB, PABIN C, QUINN T, JAWAD A, WILSON JM, et BATSHAW ML. (1997). Adenovirus-mediated in vivo gene transfer rapidly protects ornithine transcarbamylase-deficient mice from an ammonium challenge. *Pediatric Research* 41, 527-534.

ZAIS AK et MURUVE DA. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge.” *Gene Therapy* 15, 808-816.

SITES INTERNET CONSULTÉS:

<http://www.afssaps.fr>

<http://www.ann.jussieu.fr/~thiriet/csas/Glosr/Bio/Foie/HistoFoie.html>

<http://www.ceregene.com>

<http://clinicaltrials.gov>

<http://www.cornell.edu>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

<http://www.orpha.net>

<http://www.oxfordbiomedica.co.uk>

Résumé

La maladie de Crigler-Najjar de type 1 (CN-1) est une pathologie autosomique récessive très rare due à un déficit complet en Bilirubine UDP-Glucuronosyl Transférase (UGT1A1), une enzyme du métabolisme de la bilirubine. L'accumulation de bilirubine dans le sérum se traduit par un ictère intense pouvant entraîner des troubles neurologiques très graves. Le traitement actuel de CN-1 est la photothérapie. Cependant, le seul traitement curatif reste la transplantation hépatique. CN-1 est un bon modèle pour la thérapie génique car l'histologie du foie est préservée, et il existe un modèle animal, le rat Gunn. Parmi les vecteurs de thérapie génique se trouvent les virus adéno-associés, ou AAV. Ils présentent l'avantage de transduire des cellules en division ou quiescentes, et ne sont pas issus de virus pathogènes, contrairement à d'autres vecteurs. Leur efficacité a été démontrée pour le traitement de nombreuses maladies métaboliques telles que l'hémophilie B. La première partie de ce projet concernait l'utilisation de vecteurs AAV chez le jeune rat Gunn. La correction de l'hyperbilirubinémie fut transitoire, et des phénomènes intégratifs observés. La seconde partie de l'étude s'appliqua ensuite à mesurer les risques potentiels liés à cette intégration grâce à un protocole utilisant un agent promoteur de tumeurs chez le rat, le 2-acétylamino-fluorène. Les résultats obtenus n'indiquèrent pas de risque tumorigène particulier. Enfin, dans la dernière partie de cette étude, des AAV dits « self complementary », furent utilisés afin de corriger CN-1 chez le rat Gunn adulte. Le suivi des animaux montra une diminution significative de l'hyperbilirubinémie à long terme. En conclusion, les vecteurs AAVr ne semblent pas adaptés au traitement des maladies métaboliques héréditaires dans le modèle du jeune rat. Les niveaux de transduction à long terme sont très faibles, malgré la persistance du transgène sous forme intégrée au niveau de quelques hépatocytes. Ces phénomènes intégratifs semblent aléatoires, cependant de nouvelles expérimentations sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Les vecteurs AAVsc ont par contre permis la correction à long terme de l'hyperbilirubinémie chez le rat Gunn adulte. Cette étude va se poursuivre chez le primate non-humain, et pourrait ainsi constituer une première étape vers le développement d'un essai clinique de CN-1, qui pourrait ensuite être appliqué à d'autres maladies métaboliques héréditaires.

Mots-clés : Crigler-Najjar, thérapie génique, virus adéno-associé, rat Gunn

Abstract

Crigler-Najjar type 1 disease (CN-1) is a very rare, recessive inherited disorder due to a total lack in Bilirubin UDP-Glucuronosyl Transferase (UGT1A1), an enzyme of bilirubin metabolism. The accumulation of bilirubin in the serum results in an intense jaundice, and can lead to severe neurological troubles. The current treatment for CN-1 is phototherapy. However, the only curative treatment is still liver transplantation. CN-1 is a good model for gene therapy because liver histology is preserved, and there is an animal model, the Gunn rat. Among all gene therapy vectors are the adeno-associated viruses. They can transduce dividing or quiescent cells, and don't come from pathogenic viruses, contrarily to other vectors. Their efficiency has been proved for the recovery of metabolic diseases such as hemophilia B. The first part of this project was about the use of AAV vectors in the young Gunn rat. The correction of hyperbilirubinemia was transient, and integrative phenomena were observed. The second part of the study applied to measure the potential risks due to this integration with a protocol using a tumour promoting agent in rat, the 2-acetylaminofluorene. No particular risk of tumorigenesis was seen. In the last part of this study, AAV self complementary were used to correct CN-1 in the adult Gunn rat. The follow-up of animals showed a significant decrease of hyperbilirubinemia in the long-term. In conclusion, AAVr don't seem to be adapted to the treatment of hereditary metabolic diseases in the young rat model. Transduction levels in the long-term are very weak, in spite of integrated forms in some hepatocytes. These integrative phenomena seem to appear randomly, however new experiments will be necessary to confirm this hypothesis. AAVsc vectors led to the long-term correction of hyperbilirubinemia in the adult Gunn rat. This study will continue in the non-human primate model, and could be the first step towards the development of a clinical trial for CN-1, which could then be applied to other hereditary metabolic diseases.

Keywords : Crigler-Najjar, gene therapy , adeno-associated virus, Gunn rat

FLAGEUL Maude - INSERM U948 - Laboratoire de Biothérapies Hépatiques - CHU
Hôtel-Dieu - NANTES