

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**TRANSFERT DE GENE DANS LE SYSTEME NERVEUX
CENTRAL A L'AIDE DE VECTEURS RECOMBINANTS
DERIVES DE L'ADENO-ASSOCIATED VIRUS DANS UN
MODELE CANIN DE MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE
TYPE I ET CHEZ LE PRIMATE**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Médecine

Spécialité : Virologie

présentée

et soutenue publiquement par

CIRON Carine

le 22 décembre 2006, devant le jury ci-dessous

Président du jury :	Dr. Nicolas Ferry
Rapporteurs :	Pr. Patrick Aubourg Dr. Marc Peschanski
Examinatrice :	Dr. Martine Barkats
Directeur de thèse :	Dr. Philippe Moullier
Co-encadrante de thèse :	Dr. Marie-Anne Colle

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
ILLUSTRATIONS	5
INTRODUCTION	8
I La Thérapie génique :	9
II L'Adeno-associated virus (AAV)	11
1 Généralités	11
2 Sérotypes	13
3 Biologie de l'AAV	14
3.1 Entrée du virus dans la cellule	14
3.2 Transport intracellulaire	17
3.3 Devenir du génome viral	17
III L'Adeno-associated virus recombinant (AAVr) : vecteur en transfert de gènes	21
1 Production et purification des AAVr	21
1.1 Production des AAVr	21
1.2 Purification des AAVr	24
1.3 Titration des AAVr	24
2 Mécanismes de transduction et limites	25
3 Transfert de gène <i>in vivo</i> par les AAVr	31
3.1 Taille du génome encapsidé	31
3.2 Tropicisme tissulaire	34
3.3 Altération du tropisme de l'AAVr	36
3.3.1 Les vecteurs mosaïques	37
3.3.2 Les vecteurs chimériques	37
3.4 Immunogénicité des AAVr	39
3.4.1 Réponse immunitaire dirigée contre la capsid de l'AAV	39
3.4.2 Réponse immunitaire dirigée contre le transgène	41
3.5 Les essais cliniques	44
3.5.1 La mucoviscidose	44
3.5.2 L'hémophilie B	45
IV Transfert de gène dans le système nerveux central (SNC) à l'aide d'AAVr	48
1 Expression d'un transgène médiée par un AAVr dans le SNC	48
1.1 Utilisation de promoteurs spécifiques	48

1.2	Utilisation de promoteurs hybrides.....	49
1.3	Utilisation de la séquence WPRE.....	50
1.4	Régulation de l'expression du transgène <i>in vivo</i>	50
2	Tropisme cellulaire dans le système nerveux central	51
3	Méthodes permettant d'augmenter la distribution du vecteur dans le SNC	53
4	Transport axonal des AAVr.....	55
5	Immunogénicité des AAVr après injection intracérébrale.....	58
6	Applications du transfert de gène médié par l'AAV dans les désordres neurologiques...	59
6.1	La maladie de Parkinson.....	59
6.2	La maladie d'Alzheimer	61
6.3	La maladie de Huntington	62
V	Les maladies de surcharges lysosomales	64
1	Généralités	64
2	La mucopolysaccharidose de type I (MPS I):.....	66
2.1	A propos des MPS :	66
2.2	Description de la MPS I :	70
2.2.1	La maladie de Hurler :.....	72
2.2.2	La maladie de Hurler/Scheie	72
2.2.3	La maladie de Scheie.....	72
2.3	Diagnostic des MPS I :	73
2.4	L' α -L-Iduronidase humaine (Idua):.....	73
2.5	Transport aux lysosomes :	74
2.6	Histopathologie.....	75
2.7	Dysfonctionnement secondaire dans le système nerveux central.....	76
2.7.1	Modification secondaire d'autres enzymes lysosomales et de protéines lysosomales.....	76
2.7.2	Accumulation secondaire des gangliosides.....	79
2.7.3	Activation de la microglie et astroglie.....	80
2.8	Les modèles animaux	80
2.8.1	Le modèle félin.....	82
2.8.2	Le modèle canin	82
2.8.3	Le modèle murin	83
3	Approches thérapeutiques dans la mucopolysaccharidose de type I	85
3.1	Traitements symptomatiques et palliatifs	85
3.2	Thérapie systémique	86
3.2.1	Enzymothérapie substitutive	86
3.2.2	Greffe de moelle osseuse.....	89
3.2.3	Greffe de sang de cordon	91
3.3	Thérapie par transfert de gène	91
3.3.1	Transfert de gène <i>ex vivo</i>	91
3.3.2	Utilisation de cellules encapsulées.....	93
3.3.3	Transfert de gène <i>in vivo</i>	94
	RESULTATS	98
1	Résultats et discussion du premier article :	101

1.1	Objectifs.....	101
1.2	Encapsidation de séquences plasmidiques pendant la production d'AAVr	102
1.2.1	Après transfection transitoire	102
1.2.2	En utilisant des lignées d'encapsidation.....	103
1.2.3	Conclusions	103
1.3	Détection de séquences amp ^R dans les tissus après transfert de gène.....	103
1.4	Conclusions et perspectives.....	105
2	Résultats et discussion du deuxième article :	109
2.1	Objectifs :	109
2.2	Stratégie expérimentale	110
2.3	Transfert de gène chez les chiens MPS I ayant reçu une immunosuppression modérée : 111	
2.4	Transfert de gène chez les chiens MPS I ayant reçu une immunosuppression forte : 112	
2.5	Conclusions	117
2.6	Perspectives	119
3	Résultats et discussion du troisième article :	123
3.1	Objectifs :	123
3.2	Stratégie expérimentale :	124
3.3	Profil de transduction des différents sérotypes dans le SNC :.....	125
3.4	Distribution des différents sérotypes d'AAV dans le SNP, les organes et les fluides : 127	
3.5	Toxicologie :.....	129
3.6	Conclusions et perspectives :.....	129
	CONCLUSION GENERALE	131
	BIBLIOGRAPHIE	134

ILLUSTRATIONS

FIGURES :

Figure 1 : Les essais cliniques actuellement développés en thérapie génique	12
Figure 2 : Représentation schématique du cycle viral de l'AAV	15
Figure 3 : Organisation génomique de l'AAV sauvage.....	16
Figure 4 : Cycle réplcatif de l'AAV (exemple donné dans le cas où l'Adénovirus est le virus auxiliaire)	19
Figure 5 : Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr).....	20
Figure 6 : Production des vecteurs AAVr par transfection transitoire.....	23
Figure 7 : Mécanismes de transduction de l'AAVr 2.....	26
Figure 8 : Modèle de la formation du second brin de l'AAVr par appariement des génomes simple brin de polarité opposée	29
Figure 9 : Comparaison d'un AAV conventionnel avec un AAV véhiculant un ADN double brin	30
Figure 10 : Stratégies pour contourner la limitation de la taille du génome encapsidé	33
Figure 11 : Production d'un vecteur AAVr chimérique	38
Figure 12 : Les bases biochimiques et cellulaires des maladies de surcharge lysosomale	67
Figure 13 : Structure des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR).....	77
Figure 14 : Biosynthèse et transport des enzymes lysosomales aux lysosomes	78
Figure 15 : Voies potentiellement impliquées dans la pathologie des maladies de surcharge lysosomale.....	81
Figure 16 : Modèle hypothétique du dysfonctionnement du SNC dans les mucopolysaccharidoses.....	84
Figure 17: Principe de la recombinaison intramoléculaire.....	107

TABLEAUX :

Tableau I : Les principaux groupes de vecteurs viraux.....	10
Tableau II : Sérotype optimal pour un transfert de gène efficace selon les organes.....	35
Tableau III : Résumé des essais cliniques en cours utilisant l'AAVr.....	46
Tableau IV : Classification des maladies de surcharge lysosomale.....	68
Tableau V : Classification des mucopolysaccharidoses.....	71

LISTE DES ABREVIATIONS

AADC : *aromatic amino acid decarboxylase*
AAV : *Adeno-associated virus*
AAVr : *Adeno-associated virus recombinant*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
ADNc : *ADN complémentaire*
ARNm : *acide ribonucléique messenger*
ATP : *Adénosine tri-phosphate*
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
 β -glu : *β -glucuronidase*
CARE : *Cis acting replication element*
CD-MPR : *récepteur au mannose 6-phosphate cation dépendant*
CED : *convection enhanced delivery*
CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CI-MPR : *récepteur au mannose 6-phosphate cation indépendant*
CMH : *complexe majeur d'histocompatibilité*
CMV : *cytomégalovirus*
CS : *chondroïtine-sulfate*
CsCl : *chlorure de césium*
Db : *double brin*
DS : *dermatane-sulfate*
Epo : *erythropoïétine*
FGF-R : *Fibroblast Growth Factor Receptor*
FIX : *facteur IX de coagulation*
GAG : *glycoaminoglycanes*
GDNF : *glial-derived neurotrophic factor*
GFAP : *glial fibrillary acidic protein*
GFP : *green fluorescent protein*
GTPCH1 : *GTP cyclohydrolase 1*

GVH : *graft versus host*
HLA : *Human leucocyte antigen*
HS : héparane sulfate
HSV : *Herpes simplex virus*
Idua : α -L-Iduronidase
IRM : imagerie par résonance magnétique
ITR : *Inverted terminal repeat*
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
KO : *knock-out*
KS : kératane sulfate
LacZ : gène de la β -galactosidase d'E.Coli
LCR : liquide céphalo-rachidien
MBP : *myelin basic protein*
MDCK : *Madin-Darby canine kidney*
MPR : récepteur au mannose 6-phosphate
MPS1 : mucopolysaccharidose de type 1
MPTP : 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NGF : *nerve growth factor*
NSE : *neuron specific enolase*
pA : signal de polyadénylation
pb : paire de base
PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDGFR : *platelet-driven growth factor receptor*
PGK : phosphoglycérate kinase
PS-1 : préséniline-1
PS-2 : préséniline-2
PTM : *Pre-trans-splicing molecule*
RBS : *rep binding site*
RCA : *replication center assay*
RER : réticulum endoplasmique rugueux
Sb : simple brin
shRNA : *short hairpin RNA*

siRNA : *small interfering RNA*

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

TH : tyrosine hydrolase

Trs : *terminal resolution site*

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

INTRODUCTION

I LA THERAPIE GENIQUE :

L'objectif de la thérapie génique est de transférer un matériel génétique dans une cellule, un tissu ou un organe entier dans le but de corriger ou ralentir la progression d'une maladie, qu'elle soit héréditaire ou acquise. Le terme de thérapie génique peut recouvrir aujourd'hui deux techniques thérapeutiques : l'utilisation de gènes comme médicaments et la réparation des gènes. La première approche est la plus développée pour le moment et fait l'objet d'applications cliniques. La thérapie génique repose sur le développement de vecteurs permettant l'apport efficace et en toute sécurité d'un gène fonctionnel dans la cellule. Le transfert de gène peut s'effectuer *ex vivo* ou *in vivo*, selon le type cellulaire à transduire et le vecteur utilisé. *Ex vivo*, les cellules sont prélevées dans l'organisme, modifiées génétiquement avec un vecteur porteur du gène thérapeutique puis réintroduites chez le patient. *In vivo*, le gène thérapeutique est apporté directement dans l'organisme.

Il existe deux catégories de vecteurs : viraux et non viraux. Les vecteurs non viraux sont des lipides cationiques synthétiques capables de former un complexe avec l'ADN, et de pénétrer dans la cellule. Ils peuvent être produits en grande quantité et les réactions immunologiques liées à leur utilisation sont minimales. Le transfert de gène à l'aide de ces vecteurs reste cependant peu efficace, l'expression du gène n'étant que transitoire (Wolff *et al.*, 2005). Les vecteurs viraux sont des virus recombinants. Afin d'être utilisé comme vecteur, le virus est délété d'une partie ou de la totalité de son génome le rendant non pathogène et défectif pour la réplication. Le génome viral est ensuite remplacé par le gène thérapeutique.

Les vecteurs viraux actuellement utilisés en thérapie génique sont principalement dérivés des oncorétrovirus, des lentivirus, des adénovirus, des virus adéno-associés (AAV, pour *Adeno-associated virus*), ou des virus herpes simplex. Ces vecteurs viraux diffèrent par leur tropisme cellulaire, la taille du génome encapsidé, et leur immunogénicité (Tableau I) (Verma and Weitzman, 2005).

Tableau I : Les principaux groupes de vecteurs viraux

Vecteur	Matériel génétique	Capacité d'encapsulation	Tropisme	Immunogénicité	Génome	Principales limites	Principaux avantages
<u>Enveloppé</u>							
Retrovirus	ARN	8 kb	cellules en division exclusivement	faible	intégré	transduit seulement les cellules en division ; l'intégration peut induire l'oncogénèse dans certaines applications	persistance dans les cellules en division
Lentivirus	ARN	8 kb	large	faible	intégré	l'intégration peut induire l'oncogénèse dans certaines applications	persistance dans la plupart des tissus
HSV-1	ADNdb	40 kb [#] 150 kb [*]	fort pour les neurones	forte	épisomique	inflammation; expression transitoire dans les cellules autres que les neurones	grande capacité d'encapsulation tropisme fort pour les neurones
<u>Non enveloppé</u>							
AAV	ADNsb	< 5kb	large	faible	épisomique principalement	petite capacité d'encapsulation	pas d'inflammation non pathogène
Adénovirus	ADNdb	8 kb [#] 30 kb [□]	large	forte	épisomique	la capside peut entraîner une réponse inflammatoire	grande efficacité de transduction dans la majorité des tissus

[#] déficient pour la réplication, ^{*}amplicon, [□] auxiliaire dépendant. AAV, adeno-associated virus ; ADNsb, ADN simple brin ; ADNdb, ADN double brin; HSV-1, virus herpes simplex-1.

Adapté de Thomas *et al*, 2003.

La thérapie génique d'abord conçue pour le traitement de maladies héréditaires monogéniques s'est élargie à un certain nombre de maladies acquises telles que le cancer (Lowenstein, 1997), les maladies cardiovasculaires (Isner, 2002), les maladies neurodégénératives (Baekelandt *et al.*, 2000) et les maladies infectieuses (Bunnell and Morgan, 1998). Depuis 1989, de nombreux essais cliniques ont vu le jour, développés aux Etats-Unis et appliqués principalement au cancer. Les principaux vecteurs utilisés dans ces essais sont les rétrovirus (24%) et l'adénovirus (26%). Il s'agit pour 62% d'entre eux d'essais de phase I (figure 1) (Thomas *et al.*, 2003).

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

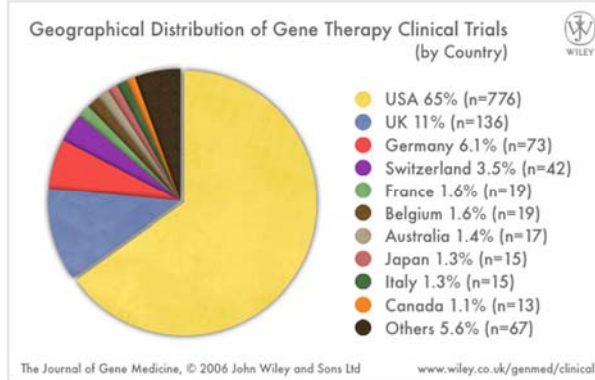
II L'ADENO-ASSOCIATED VIRUS (AAV)

1 Généralités

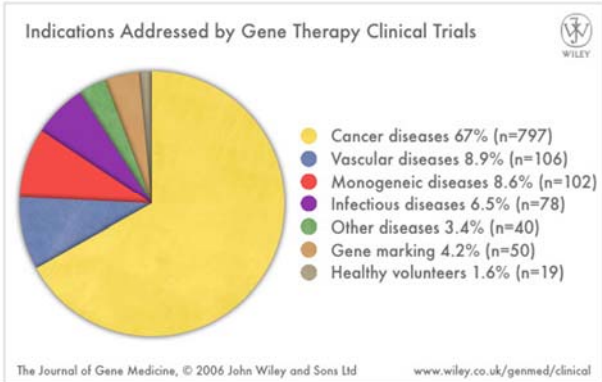
L'AAV est un virus à ADN simple brin linéaire non enveloppé de 4679 bases, appartenant à la famille des Parvovirus. Jusqu'à aujourd'hui, aucune pathologie n'a été associée, chez l'homme, à une infection par l'AAV. Pourtant près de 95% de la population humaine est séropositive pour l'AAV de sérotype de 2 (Chirmule *et al.*, 1999b). Ce virus a d'abord été découvert comme contaminant des cultures d'adénovirus (Atchison *et al.*, 1965). Classé parmi les Dépendovirus, il ne se réplique qu'à la faveur d'une co-infection par un virus auxiliaire (adénovirus ou herpès virus). En l'absence de co-infection, le virus sauvage entre dans une phase de latence qui se caractérise par l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, en un site spécifique du chromosome 19, le site AAVS1 (figure 2). Cette intégration site spécifique est bien décrite *in vitro* (Kotin *et al.*, 1992; Linden *et al.*, 1996; Philpott *et al.*, 2002); elle est moins fréquente *in vivo* où l'AAV persiste principalement sous forme épisomique (Chen *et al.*, 2005; Schnepf *et al.*, 2005; Warrington and Herzog, 2006).

Figure 1 : Les essais cliniques actuellement développés en thérapie génique

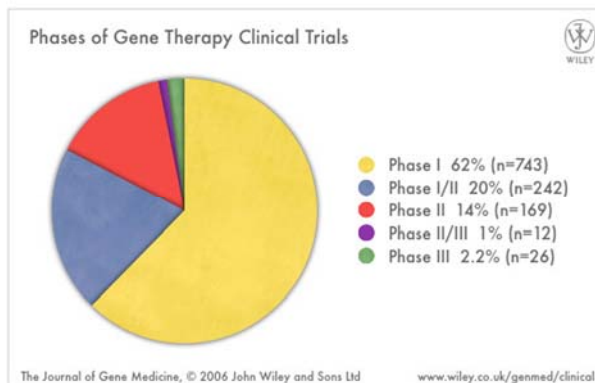
A/



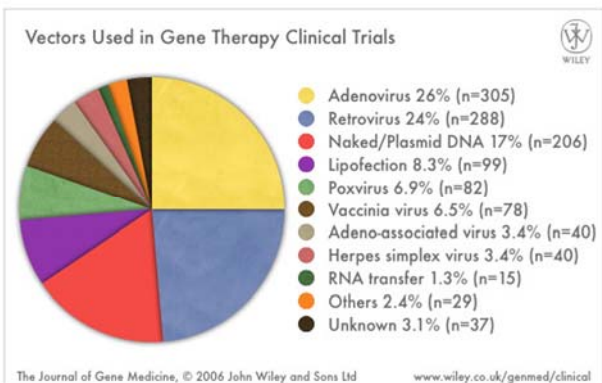
B/



C/



D/



Source : John Wiley and Sons , Ltd, www.wiley.co.uk/genmed/clinical.

A/ Répartition des essais cliniques dans le monde

B/ Distribution selon les maladies traitées

C/ Phases des essais cliniques en cours

D/ Distribution selon les vecteurs utilisés

L'AAV est un virus d'organisation génomique simple. Son génome présente deux cadres de lecture, rep et cap, encadrés par deux séquences terminales inversées répétées (ITR, pour *inverted terminal repeats*) de 145 paires de bases chacune, portant en *cis* les signaux nécessaires pour l'encapsidation, la réplication et l'intégration du virus. Le gène rep code pour quatre protéines régulatrices : Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40. Les protéines Rep 68 et 78 sont sous le contrôle du promoteur p5. Elles diffèrent dans leur partie C-terminale suite à un épissage alternatif du transcrit commun. Ces deux protéines sont impliquées dans l'activation des gènes de l'AAV durant la phase de production, ou dans leur répression pendant la phase de latence. Les deux autres protéines Rep 52 et Rep 40 sont sous le contrôle du promoteur p19. Elles sont nécessaires pour l'encapsidation. Le gène cap sous le contrôle du promoteur p40 code pour 3 protéines de la capside, VP1, VP2 et VP3 qui diffèrent dans leur partie N-terminale suite à un épissage alternatif du transcrit commun (figure 3). La capside de l'AAV constitue une particule de 20 à 24 nm de diamètre. Elle résulte de l'assemblage de 60 protéines de capsidation avec un ratio de 1 :1 :18 de VP1 :VP2 :VP3 (Snyder, 1999; Flotte, 2004).

2 Sérotypes

A ce jour, douze sérotypes d'AAV ont été isolés dans des stocks d'adénovirus ou dans des tissus humains ou de primates (Atchison *et al.*, 1965; Schmidt *et al.*, 2006). Les ITR et le génome rep-cap sont différents pour chaque sérotype bien qu'ils présentent parfois de fortes homologies. Un nouveau sérotype, par définition, est un virus nouvellement isolé ayant un profil sérologique différent des sérotypes existants et caractérisés. Sur cette base, seuls les AAV1 à 5 et les AAV 7 à 9 peuvent être définis comme de vrais sérotypes, étant donné que la sérologie de l'AAV6 est identique à celle de l'AAV1 (Gao *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004b) et que les profils sérologiques de l'AAV 10 et 11 ne sont pas bien caractérisés (Mori *et al.*, 2004). Bien qu'ils ne correspondent pas aux critères, ils sont considérés dans la littérature comme des sérotypes (Wu *et al.*, 2006a). L'AAV 2 est le premier sérotype identifié et aussi le mieux caractérisé. Il a fait l'objet de nombreuses études jusqu'à aujourd'hui. L'AAV1, l'AAV2, l'AAV3, l'AAV4 et l'AAV6 ont été isolés comme contaminants de préparations d'adénovirus alors que l'AAV5 provient d'une verrue génitale humaine (Atchison *et al.*, 1965; Melnick *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Mayor and Melnick, 1966; Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984; Georg-Fries *et al.*, 1984; Rutledge *et al.*, 1998; Bantel-Schaal *et al.*, 1999) (Gao *et al.*, 2005). L'AAV2, 3 et 5 semblent être d'origine

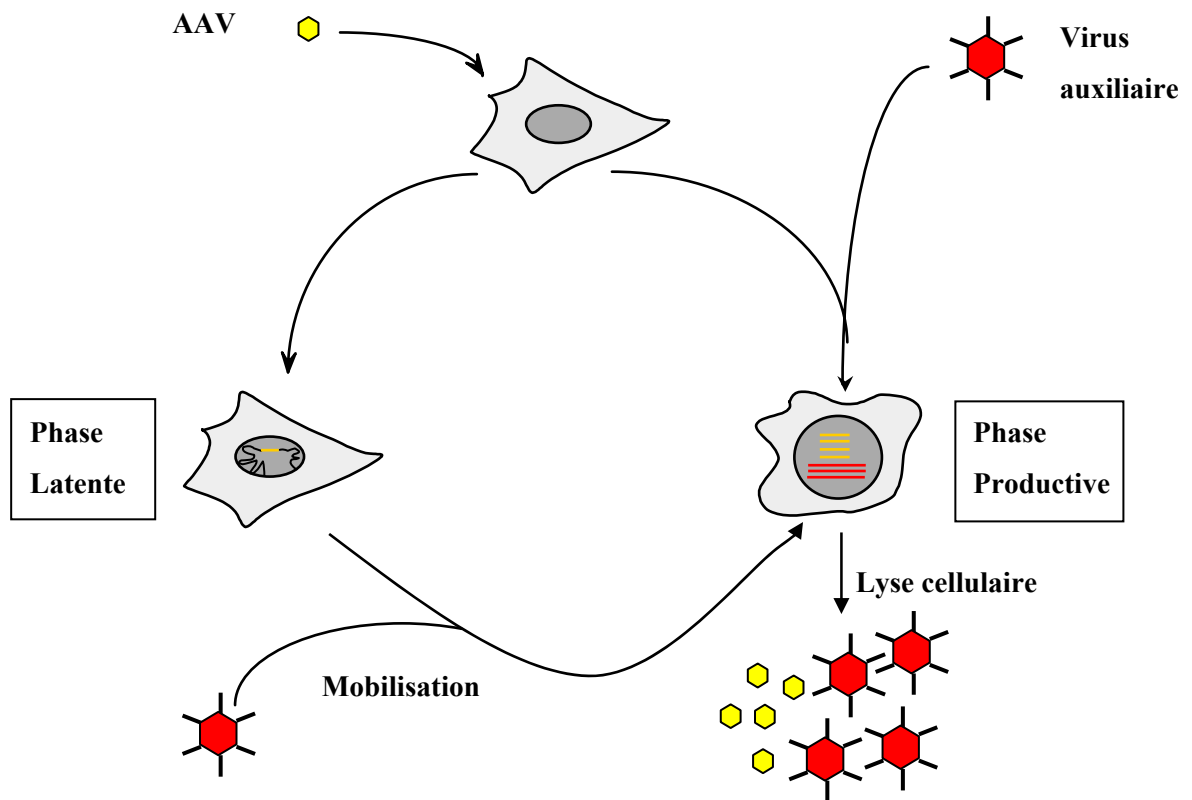
humaine à cause de la prévalence d'anticorps neutralisants dirigés contre ces capsides dans la population humaine (Blacklow *et al.*, 1968; Erles *et al.*, 1999). Au contraire, l'AAV4 semble être d'origine simienne (Parks *et al.*, 1970). Pour l'AAV1 il est plus difficile de conclure : des anticorps neutralisants ont été détectés dans du serum de primates (Parks *et al.*, 1970) et pourtant le génome viral AAV1 a été isolé à partir de tissus humains (Gao *et al.*, 2004b). L'AAV6, lui, est un hybride naturel de l'AAV1 et l'AAV2. Les régions correspondant à l'ITR gauche et au promoteur p5 sont identiques à celles de l'AAV2 et sa capside ne diffère que de six acides aminés de l'AAV1 (Rutledge *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999).

3 Biologie de l'AAV

3.1 Entrée du virus dans la cellule

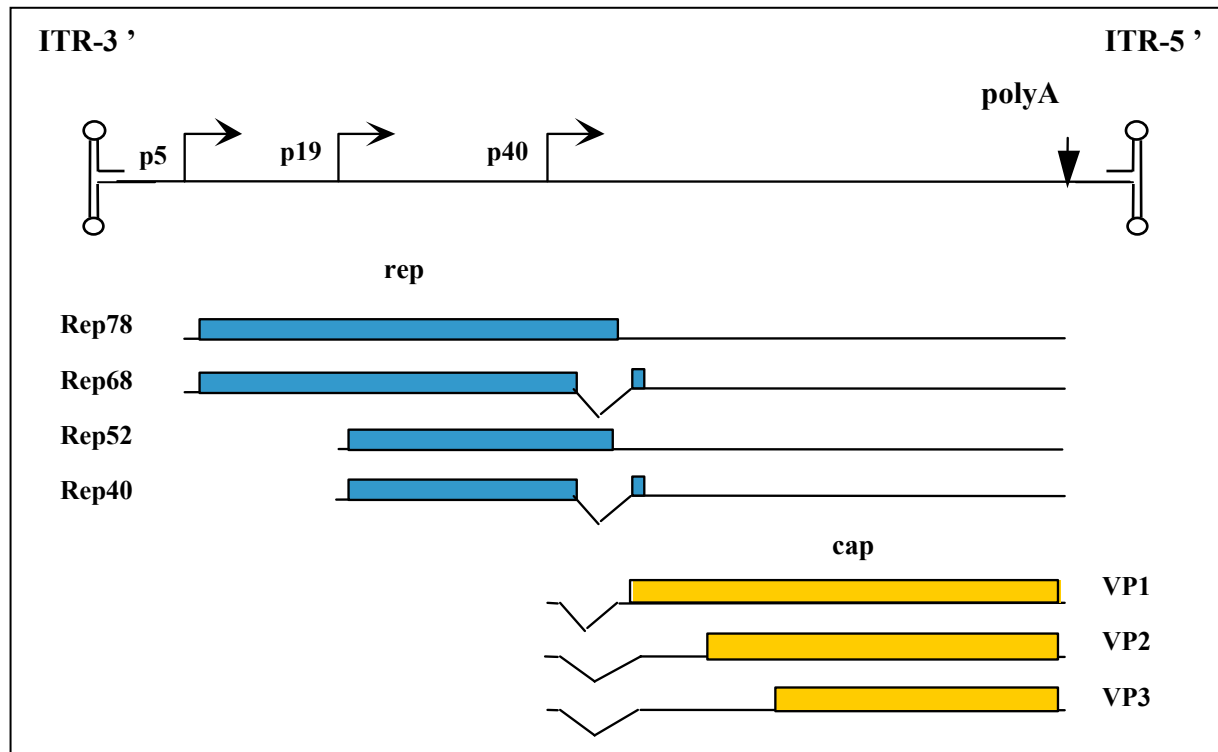
L'entrée de l'AAV dans la cellule est initiée par l'interaction de la capside avec des récepteurs présents à la surface cellulaire. Cette première étape permet l'attachement du virus à la cellule. Cependant pour que l'infection soit efficace, des interactions avec des co-récepteurs sont nécessaires. Ce sont d'ailleurs ces interactions qui détermineront la voie intracellulaire impliquée dans l'entrée du virus. Le récepteur primaire de l'AAV2 a été identifié en 1998 (Summerford and Samulski, 1998). Il s'agit de protéoglycanes héparane-sulfates (HSPG, *heparan sulfate proteoglycans*). Par la suite les co-récepteurs de l'AAV2 ont été mis en évidence : le récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGF-R1) (Qing *et al.*, 1999), l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (Summerford *et al.*, 1999), et le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (Kashiwakura *et al.*, 2005). L'AAV3 se lie également aux protéoglycanes héparane sulfate (Handa *et al.*, 2000; Rabinowitz *et al.*, 2002). L'AAV4 et l'AAV5, eux, se lient respectivement à des acides sialiques α -2,3-O-liés et α -2,3-N-liés (Kaludov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2001). Le co-récepteur de l'AAV5 a été identifié comme étant le récepteur du facteur de croissance des thrombocytes (Di Pasquale *et al.*, 2003). L'AAV1 et l'AAV6 se lient à des acides sialiques α -2,3 et α -2,6-N-liés (Wu *et al.*, 2006b). Le récepteur cellulaire pour l'AAV8 a été mis en évidence récemment. Il s'agit du récepteur de la laminine de 37/67 kDa (LamR) (Akache *et al.*, 2006). Ce récepteur joue également un rôle dans la transduction pour trois autres sérotypes : l'AAV2, l'AAV3 et l'AAV9. Les récepteurs et co-récepteurs des autres sérotypes restent à identifier.

Figure 2 : Représentation schématique du cycle viral de l'AAV



En l'absence de virus auxiliaire, l'infection des cellules par l'AAV conduit à une phase de latence qui se caractérise par l'absence d'expression des gènes rep et cap et l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. En présence de virus auxiliaire (adénovirus, herpesvirus), la co-infection ou la mobilisation du génome viral constitue la phase productive, caractérisée par l'expression des gènes de l'AAV, la répllication du génome et son encapsidation au niveau nucléaire. Les virions néoformés sont libérés dans le milieu extérieur après lyse cellulaire provoquée par le virus auxiliaire.

Figure 3 : Organisation génomique de l'AAV sauvage



Le génome de l'AAV se compose d'une molécule d'ADN simple brin de 4679 nucléotides, de polarité positive ou négative. Les gènes rep et cap sont encadrés par les séquences ITR (*Inverted Terminal Repeats*) de 145 nucléotides. Les protéines Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40 sont issues de 2 transcrits initiés par les promoteurs p5 et p19 et épissés alternativement. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont issues d'un même transcrit initiés par le promoteur p40.

L'AAV12, caractérisé récemment, n'utilise ni un glycosaminoglycane héparane sulfate, ni un acide sialique comme récepteur (Schmidt –Abstract ASGT 2006).

3.2 Transport intracellulaire

Le processus permettant l'internalisation de l'AAV dans la cellule a été étudié uniquement pour l'AAV2 et l'AAV5. Après s'être lié à son récepteur et à ses co-récepteurs, l'AAV2 est endocyté dans la cellule *via* un puit recouvert de clathrine (Bartlett *et al.*, 2000) selon un mécanisme dynamine dépendant (Duan *et al.*, 1999). L'endocytose de l'AAV5 se fait également principalement *via* des puits recouverts de clathrine. L'AAV2 transite ensuite dans les compartiments endosomaux, alors que ce transport se ferait plutôt à travers des citernes de l'appareil de Golgi pour l'AAV5 (Wu *et al.*, 2006a). L'AAV doit ensuite s'échapper des endosomes afin d'être transloqué dans le noyau. Le transport au noyau se ferait grâce à un réseau de tubules par l'intermédiaire de molécules ATP dépendantes (Seisenberger *et al.*, 2001). Les mécanismes aboutissant à la translocation nucléaire et au désassemblage de la capsid restent encore mal connus. Il semblerait notamment que l'AAV n'entre pas dans le noyau par les pores nucléaires (Hansen *et al.*, 2001). Le moment où a lieu la décapsidation n'est pas non plus clairement identifié, avant ou après l'entrée dans le noyau. Il est vraisemblable que les mécanismes aboutissant à l'entrée du virus dans le noyau et au désassemblage de la capsid soient différents entre les sérotypes. De trente minutes à quelques heures sont nécessaires pour que les particules virales se retrouvent dans le noyau après l'infection (Berns and Giraud, 1996) (pour revue Ding *et al.*, 2005).

3.3 Devenir du génome viral

Une fois libéré dans le noyau, le génome viral simple brin (sb) doit être converti en double brin (db), afin de former des matrices utilisables pour la machinerie de transcription cellulaire.

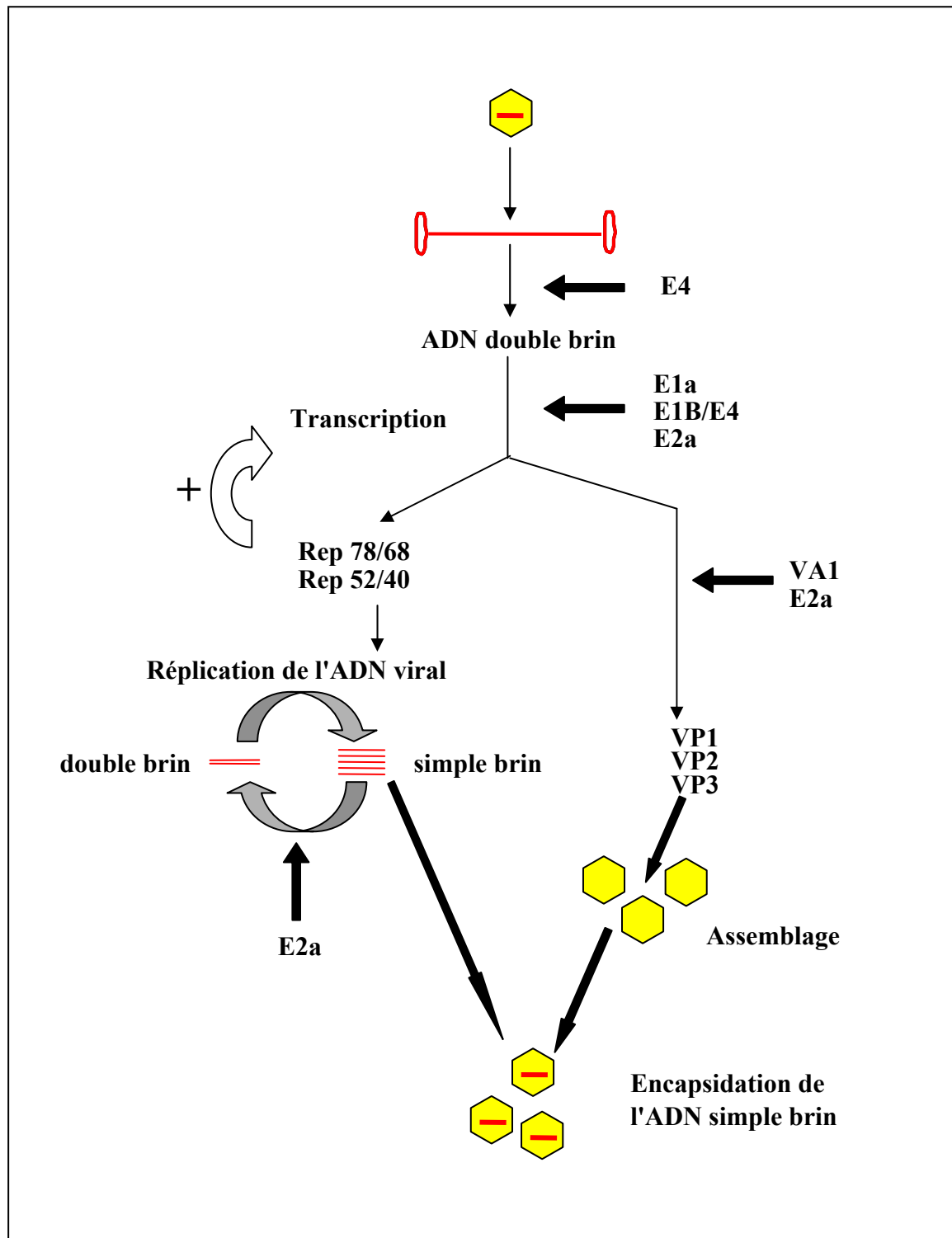
En l'absence de virus auxiliaire, l'AAV entre dans une phase de latence caractérisée par l'absence d'expression des gènes viraux et par l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. Cette intégration a lieu au niveau d'un site préférentiel AAVS1

situé dans le chromosome 19. Elle a été identifiée et caractérisée *in vitro*. L'intégration du génome viral db se fait par un mécanisme de recombinaison non homologue. Les génomes intégrés sont retrouvés principalement sous forme de tandems en position tête-queue, composés au maximum d'une dizaine de copies. Les protéines Rep 78 et Rep 68 reconnaissent et facilitent le rapprochement du site AAVS1 et de l'ITR du virus (McCarty *et al.*, 2004).

A la faveur d'une infection ultérieure par un virus auxiliaire (Adénovirus ou Herpes virus), le génome viral est excisé (étape de mobilisation, ou *rescue*), par l'intermédiaire des protéines Rep 78/68. L'AAV entre alors dans une phase productive (appelée encore phase répllicative ou phase lytique), qui se caractérise par une synthèse des protéines Rep et Cap associée à une réplication du génome viral. Les éléments impliqués dans la réplication du génome de l'AAV sont les ITR, les protéines Rep et les protéines du virus auxiliaire. Les ITR comportent un site RBS (« *Rep Binding Site* ») et un site de coupure trs (« *terminal resolution site* »). Les ITR fonctionnent comme des origines de réplication. L'extrémité 3' de l'ITR gauche peut servir d'amorce pour l'initiation de la synthèse d'ADN par une ADN polymérase cellulaire, dans le sens 5' vers 3'. Cette étape correspond à une forme dimérique dont l'une des extrémités comporte un ITR complètement fermé. Les protéines Rep 78/68 provoquent la coupure de cet ITR par leur fixation sur le RBS et leur activité endonucléase au niveau du trs adjacent, puis permettent le déploiement de l'ITR par leur activité hélicase, ce qui permet de finir la conversion du simple brin en double brin transcriptionnellement actif. Le mécanisme mis en jeu aboutit à l'inversion des ITR. Le repliement des ITR permet la formation de deux ADN simple brin, pouvant soit subir un nouveau cycle de réplication, soit être encapsidé. Les protéines structurales s'accumulent rapidement et s'assemblent pour former des capsides vides en moins de vingt minutes (Yuan and Parrish, 2001). Le processus d'insertion du génome simple brin dans ces capsides est plus lent, sans que l'on en connaisse la durée précise. Les protéines Rep 52 et Rep 40, grâce à leur activité hélicase, sont impliquées dans ce processus (figure 4) (King *et al.*, 2001; Timpe *et al.*, 2005). Les particules nouvellement formées dans le noyau sont sécrétées dans le milieu extracellulaire à la suite de l'effet cytopathique induit par le virus auxiliaire.

Cette phase lytique de production de particules infectieuses peut également être directement induite par la co-infection d'une cellule par l'AAV et le virus auxiliaire.

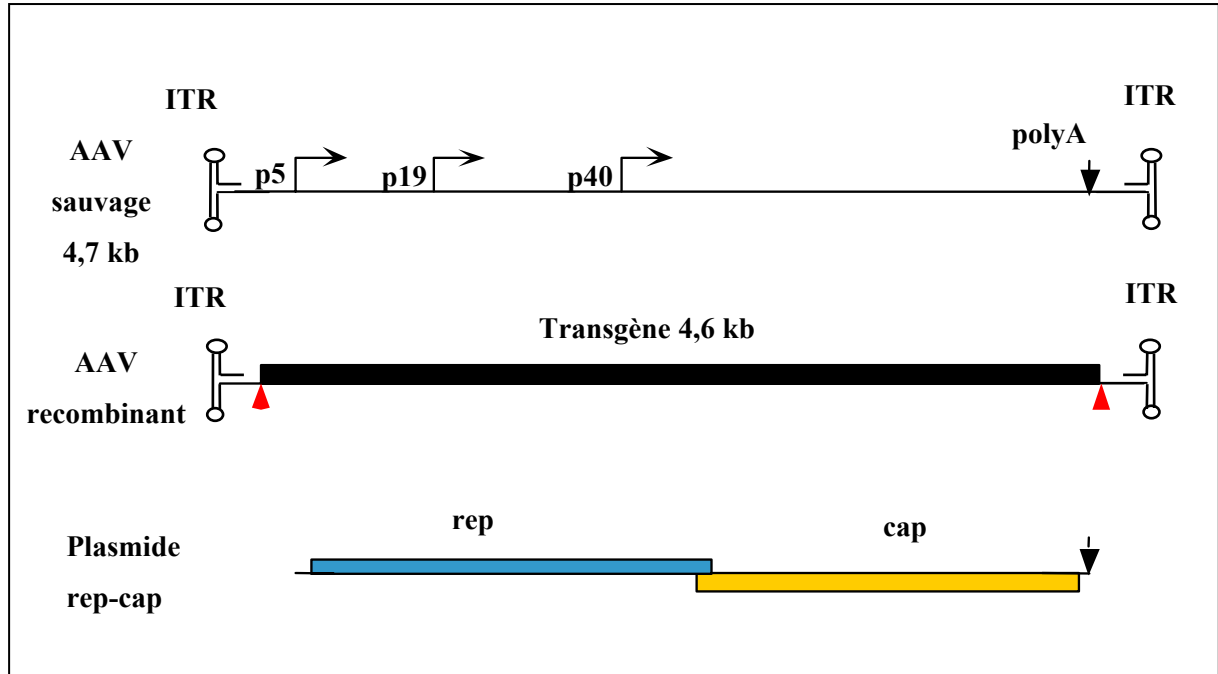
Figure 4 : Cycle réplcatif de l'AAV (exemple donné dans le cas où l'Adénovirus est le virus auxiliaire)



Adapté de Salvetti *et al* 1999.

Le schéma détaille les événements cellulaires de la phase productive. L'ensemble du cycle réplcatif se déroule au niveau nucléaire et nécessite la présence de facteurs auxiliaires. Les flèches en gras indiquent les protéines adénovirales qui ont un effet *helper*.

Figure 5 : Organisation génomique de l'AAV recombinant (AAVr)



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

III L'ADENO-ASSOCIATED VIRUS RECOMBINANT

(AAVr) : VECTEUR EN TRANSFERT DE GENES

L'adeno-associated virus est un virus non pathogène, avec un génome simple brin et capable d'infecter des cellules quiescentes : autant de qualités qui en font un virus de choix pour le développement d'un vecteur viral utilisable en transfert de gène.

1 Production et purification des AAVr

Dans les vecteurs AAVr, les gènes rep et cap de l'AAV sauvage sont remplacés par le transgène associé aux éléments nécessaires à la régulation de son expression (un promoteur et un signal de polyadénylation), et encadré par les deux séquences ITR qui sont les seules séquences virales conservées. La taille du vecteur, ITR comprises, ne peut dépasser de beaucoup celles du virus sauvage, ce qui laisse environ 4,6 kb de séquence à insérer (figure 5). Au-delà de cette taille, l'ADN inséré est souvent incomplet ou le rendement de la production d'AAVr est diminué (Dong *et al.*, 1996).

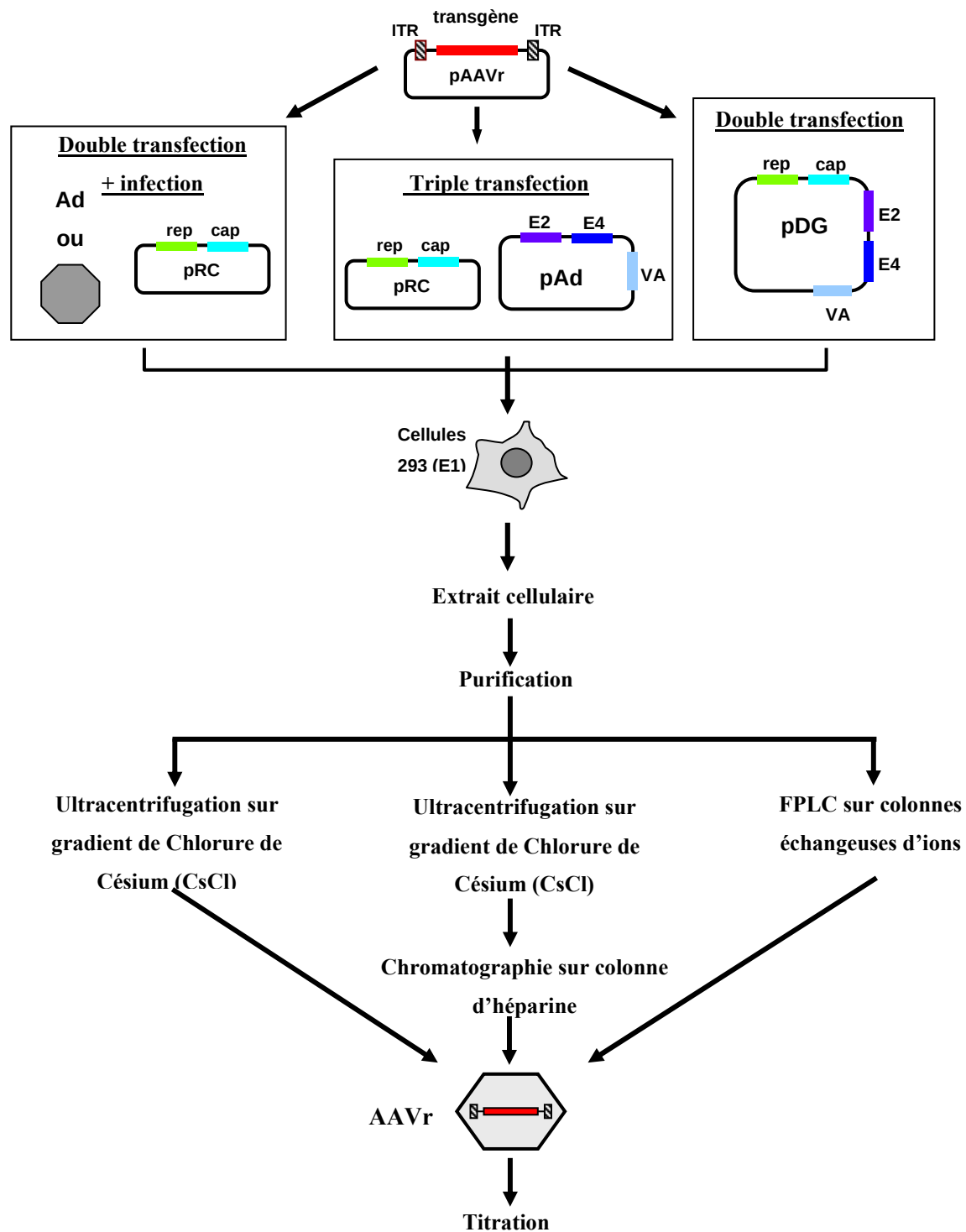
1.1 Production des AAVr

La méthode classique de production des AAVr consiste à co-transfecter des cellules 293 (dérivées de cellules embryonnaires rénales et exprimant de façon stable la région E1 de l'adénovirus) avec le plasmide vecteur AAVr et un plasmide portant les gènes rep et cap. Les fonctions auxiliaires ou helper sont ensuite apportées pour obtenir une production d'AAVr. Ces fonctions helper ont été initialement apportées par infection avec un adénovirus. Puis l'infection a été abandonnée au profit d'une transfection avec un plasmide portant les fonctions adénovirales essentielles (Grimm *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1998). La séquence rep-cap et les fonctions *helper* peuvent également être apportés par un même plasmide, comme le plasmide pDG. Ces méthodes permettent d'obtenir des stocks d'AAVr dépourvus de particules adénovirales (figure 6). Malheureusement, la méthode de transfection transitoire est longue et ne permet de produire qu'environ 10^3 à 10^4 particules par cellule. Elle n'est donc pas adaptée à une production à grande échelle, indispensable pour le développement d'essais

cliniques. Pour faire face à ce problème, des méthodes de production utilisant des lignées d'encapsidation ont ainsi été développées. Dans ces lignées les gènes rep et cap et parfois le transgène flanqué des deux ITR sont intégrés dans le génome cellulaire. Ces lignées devraient permettre de simplifier la production d'AAVr et d'améliorer le rendement de production. Avec de telles lignées cellulaires, il suffira d'infecter ces cellules avec un virus auxiliaire, éliminant ainsi les étapes limitantes de transfection. La première étape pour obtenir ces lignées d'encapsidation consiste à faire exprimer de façon stable les gènes rep et cap dans les cellules. Cette étape est limitée par la toxicité de la protéine Rep, qui exerce un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Labow *et al.*, 1987; Khleif *et al.*, 1991). Les protéines Cap sont également toxiques (observations non publiées, Salvetti et ses collaborateurs) car elles engendrent l'accumulation de capsides vides dans le nucléole de la cellule (Wistuba *et al.*, 1997). Leur accumulation interfère avec le fonctionnement du nucléole et contribue à l'effet toxique observé (pour revue Salvetti et Nony 2001). Malgré la toxicité de Rep et Cap, des clones cellulaires dérivés de cellules HeLa ont été isolés. Ces clones contiennent, intégrées dans leur génome, une ou plusieurs copies des gènes rep et cap de l'AAV2 sous le contrôle de leurs promoteurs natifs et sans les ITR (Gao *et al.*, 1998; Chadeuf *et al.*, 2000). Les promoteurs de l'AAV sont préférables pour diriger l'expression des gènes rep et cap, étant donné que ces séquences, et en particulier le promoteur p5, sont naturellement silencieuses en l'absence de virus auxiliaire (Beaton *et al.*, 1989; Pereira *et al.*, 1997). En revanche, aucun clone cellulaire Rep/Cap n'a été obtenu à partir de cellules 293 en utilisant les promoteurs de l'AAV, et cela parce que les cellules 293 expriment constitutivement E1A qui est un activateur du promoteur p5.

La seconde étape dans le développement de lignées stables consiste à intégrer de façon stable dans le génome de ces lignées le transgène flanqué par les deux ITR de l'AAV. Cela peut se faire par infection avec un vecteur AAVr ou par transfection avec un plasmide AAVr. Plusieurs groupes ont développé des clones stables avec cette seconde stratégie (Blouin *et al.*, 2004).

Figure 6 : Production des vecteurs AAVr par transfection transitoire



Adapté de Salvetti *et al*, 1998.

Classiquement les cellules 293 sont transfectées au moyen du plasmide vecteur AAVr et d'un plasmide transcomplémentant apportant les gènes rep-cap. Les gènes auxiliaires adénoviraux sont soit apportés par infection adénovirale (à gauche), soit par transfection d'un plasmide adénoviral (au milieu), ou d'un plasmide comportant les gènes rep-cap et auxiliaire adénoviraux (à droite). Après récolte et lyse des cellules, l'extrait cellulaire est purifié sur gradient de densité ou chromatographie FPLC.

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

1.2 Purification des AAVr

Les AAVr produits subissent ensuite une étape de purification. Cette étape est critique pour le développement de vecteurs utilisés en clinique. Les méthodes conventionnelles basées sur l'utilisation de gradients de densité (chlorure de césium ou iodixanol) sont difficilement adaptables à une production à grande échelle. De plus, ces méthodes de purification restent imparfaites ; les stocks présentent des impuretés pouvant conduire à une inflammation locale *in vivo* (Blouin *et al.*, 2004). Un processus de purification basé sur deux étapes de chromatographie effectuées sur des résines échangeuse d'ions a été développé récemment (Brument *et al.*, 2002; Snyder and Flotte, 2002; Zolotukhin *et al.*, 2002). Les améliorations des méthodes de production et de purification concernent principalement l'AAV2. Elles sont à adapter et à optimiser pour les autres sérotypes (Auricchio *et al.*, 2001).

1.3 Titration des AAVr

Quatre techniques sont utilisées pour la titration des particules virales en routine :

- **Le Dot Blot** qui permet de connaître le nombre de particules physiques contenant le génome par mL. Il repose sur la quantification de l'ADN viral encapsidé, en comparaison avec des quantités connues du plasmide vecteur.
- **La PCR quantitative** qui permet également de connaître le nombre de particules pleines par mL.
- **Le RCA (« Replication Center Assay »)** qui permet de déterminer le nombre de particules infectieuses par mL. Ce test est basé sur la mesure de la réplication d'un vecteur AAV dans une cellule co-infectée par de l'adénovirus, qui apporte les fonctions « helper », et de l'AAV sauvage, qui apporte les fonctions Rep (McLaughlin *et al.*, 1988). Les fonctions Rep peuvent être également apportées par des cellules qui expriment de façon stable ce gène (Salveti *et al.*, 1998).

- Une autre technique de titration est basée sur **la détermination du nombre de cellules transduites**. Ce test peut être effectué pour des AAVr porteurs d'un gène marqueur et pour lesquels il est possible de détecter le produit d'expression du transgène en présence d'adénovirus (par exemple, la GFP en microscopie à fluorescence, ou la β -Galactosidase après coloration). Pour ces deux exemples, les titres sont exprimés en « GFU » (GFP forming unit) ou « LFU » (LacZ forming unit).

Au-delà des variabilités de rendement d'une préparation à l'autre, le rapport entre les mesures obtenues avec ces trois types de test est généralement constant pour un même sérotype. Pour l'AAVr 2, on retrouve ainsi un rapport d'un facteur 50 à 100 entre le nombre de physiques et le nombre de particules infectieuses, et un rapport de 20 à 50 entre le nombre de particules infectieuses déterminé par RCA et celui mesuré en déterminant l'expression du transgène (Salvetti *et al.*, 1998).

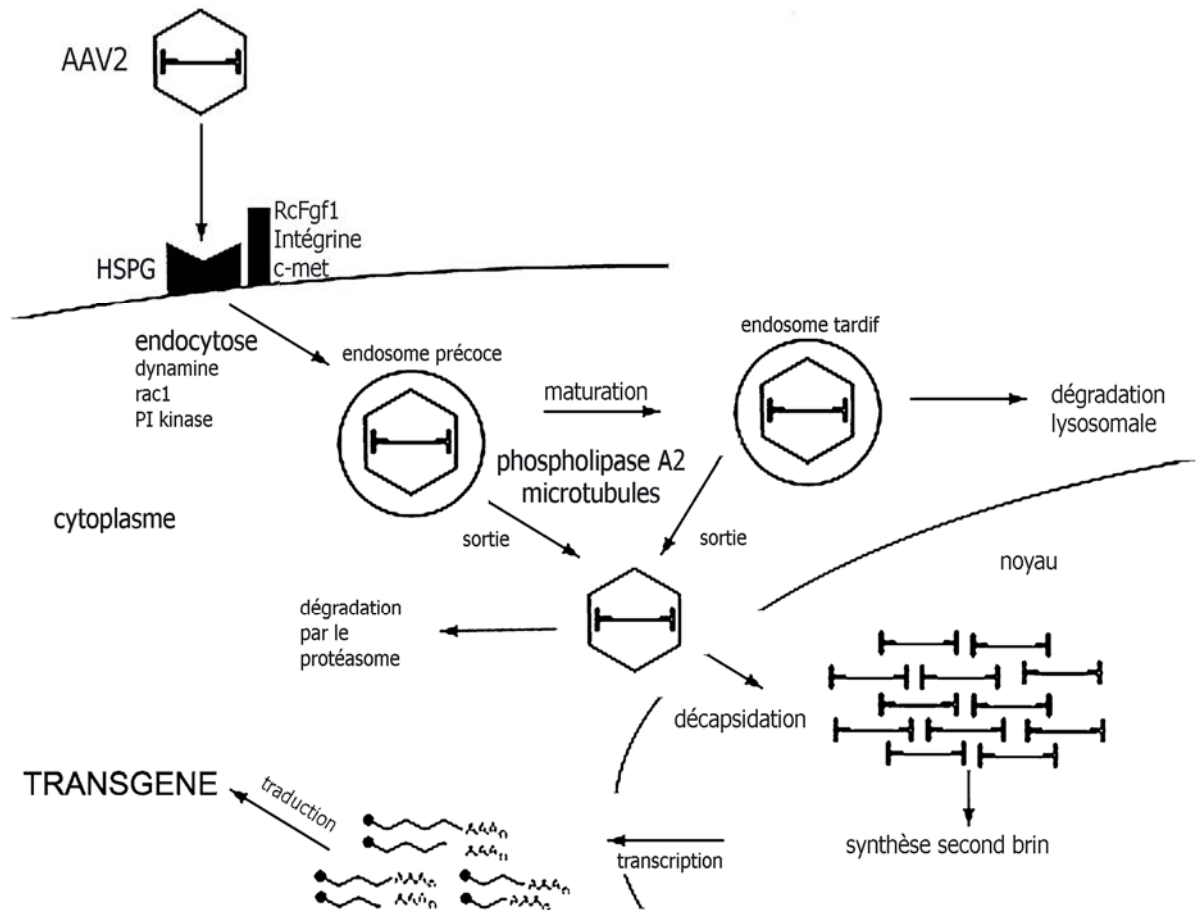
Ces méthodes de titration permettent de comparer des préparations virales pour un même sérotype. Pour des sérotypes différents, les méthodes basées sur des infections (RCA et GFU/LFU) perdent leur intérêt. L'affinité propre d'un sérotype pour un type cellulaire donné (Rabinowitz *et al.*, 2002) introduit un biais. Dans ce cas, le titre viral doit être obtenu en quantifiant le nombre de génomes encapsidés par PCR quantitative ou par Dot Blot.

2 Mécanismes de transduction et limites

La transduction correspond à une succession d'étapes aboutissant à l'expression du transgène : fixation du vecteur à la membrane cellulaire, entrée dans le cytoplasme, migration vers le noyau, et entrée dans le compartiment nucléaire où l'ADN sera libéré pour donner des formes double brin transcriptionnellement active (figure 7). Autant d'étapes qui peuvent être limitantes pour l'obtention d'un transfert de gène efficace.

La fixation, l'entrée dans la cellule et la migration de l'AAVr vers le noyau sont dépendantes du sérotype utilisé (cf. § Biologie de l'AAV) et limitent l'efficacité du transfert de gène. Selon les voies intracellulaires impliquées l'efficacité de transduction sera différente. Ainsi chaque sérotype d'AAVr sera plus ou moins approprié pour transduire un type cellulaire donné (cf. § Tropisme tissulaire).

Figure 7 : Mécanismes de transduction de l'AAVr 2



Adapté de Warrington et al, 2006.

L'AAV2 se lie à son récepteur cellulaire HSPG (*Heparan sulfate proteoglycan*) et est endocyté via 3 co-récepteurs (fgf1r, intégrine, et les récepteurs c-met). L'endocytose de l'AAV2 est dépendante de système dynamine, rac1, et de kinases phosphate inositol. L'AAV2 sort des compartiments endosomaux précoce et tardif en utilisant une activité phospholipase A2 puis est transloqué au noyau par des microtubules. Une partie du vecteur peut être dégradé par le protéasome ou dans le lysosome. Après décapsidation, l'ADN est libéré pour donner des formes double brin transcriptionnellement active qui permettront la synthèse du transgène.

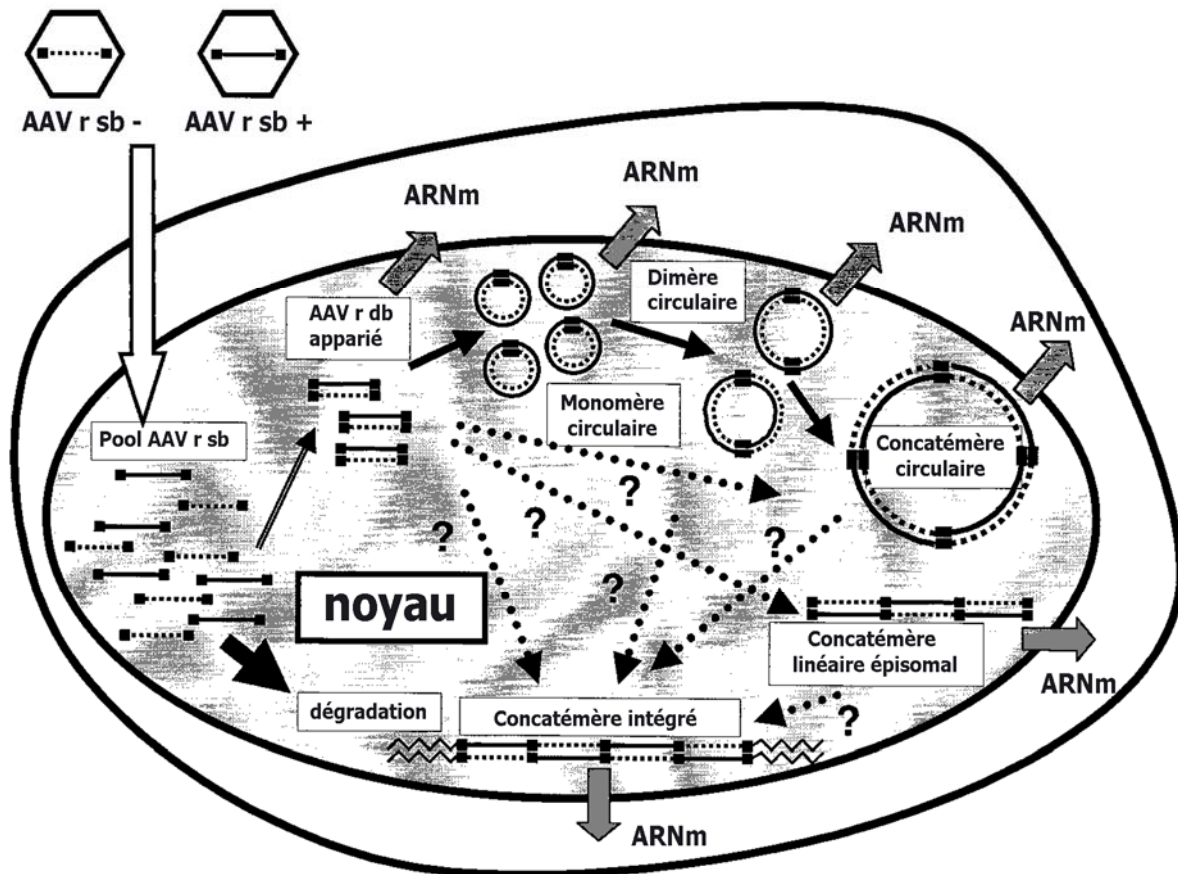
Une autre étape limitante est la conversion de l'ADN simple brin (sb) en ADN double brin (db). Des études faites principalement *in vitro* ont montré qu'une protéine cellulaire appelée ssD-BP (*single stranded D binding protein*) est impliquée dans la conversion de l'ADN simple brin en double brin (Wang *et al.*, 1996; Qing *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Cette protéine existe sous deux états : phosphorylé et déphosphorylé. A l'état phosphorylé elle se fixe et bloque la séquence D(-) de l'ITR de l'AAV2, une séquence simple brin de 20 nucléotides placées en 5' de l'ITR 3', et complémentaire d'une séquence D(+) située à l'extrémité 5' du génome. La forme déphosphorylée de cette protéine permet, elle, la synthèse du second brin d'ADN, permettant ainsi l'expression du transgène (Mah *et al.*, 1998; Qing *et al.*, 1998). Une autre protéine cellulaire, FKBP52, joue un rôle similaire (Zhao *et al.*, 2006). L'efficacité de transduction par l'AAVr peut être augmenté en administrant des inhibiteurs de tyrosine phosphatase (Zhong *et al.*, 2004). La synthèse d'ADN double brin à partir des simples brins transférés n'a pas été confirmée *in vivo*. L'hypothèse d'un mécanisme d'appariement passif des brins complémentaires pour former l'ADN double brin a été proposée *in vivo* (Nakai *et al.*, 2000b). En effet, des brins de polarité + et - se trouvent encapsidés lors de la production d'AAVr et peuvent s'apparier une fois libérés dans le noyau (figure 8). Des recombinaisons intra- et intermoléculaires conduisent à la formation de formes circulaires et de concatémères, qui persistent principalement sous forme épisomique (Duan *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2003; Yue and Duan, 2003; Schnepf *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré qu'une grande partie de l'ADN simple brin est dégradée au cours des premières semaines après injection dans le muscle (Xiao *et al.*, 1996) et le foie (Miao *et al.*, 1998). Passé ce délai, la formation de l'ADN double brin permet l'expression rapide du transgène.

La conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin apparaissant être une étape limitante à la transduction efficace d'une cellule par un vecteur AAVr , de nouveaux vecteurs AAVr véhiculant de l'ADN double brin, et appelés scAAVr pour *self-complementary* AAVr, ont récemment été développés (Hirata and Russell, 2000; McCarty *et al.*, 2001) (figure 9). Ces vecteurs exhibent des capacités de transduction supérieure à celle des AAVr classiques véhiculant le même génome en simple brin : ils permettent une expression du transgène plus rapide et plus importante *in vivo* dans le foie, le cerveau et le muscle de souris (McCarty *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005). Dans une étude récente, l'efficacité de transduction de deux sérotypes de scAAVr, le scAAVr 7 et le scAAVr 8, portant un génome double brin a été comparée avec un AAVr 2 classique véhiculant un génome simple brin dans

le foie de macaques (Gao *et al.*, 2006). Le scAAVr 7 et le scAAVr 8 permettent un transfert de gène stable et une efficacité de transduction 20 fois plus élevée comparée à l'AAVr 2 traditionnel. Le seul inconvénient des vecteurs scAAVr est qu'ils ne peuvent être utilisés que pour le transfert de gènes de 2,3 kb au maximum.

De petits agents thérapeutiques, tels que les siRNA (*small interfering RNA*) ou les ribozymes, semblent être les candidats idéals pour de tels vecteurs. Il est possible, par exemple, de supprimer efficacement l'expression du gène MDR1 dans des cellules cancéreuses du sein en utilisant un vecteur AAVr double brin portant une cassette d'expression siRNA (Xu *et al.*, 2005). Le gène MDR1 code pour une glycoprotéine membranaire qui favorise l'extrusion des xénobiotiques, entraînant une diminution de la concentration des médicaments dans la cellule. Cette approche va permettre d'étendre le transfert de gène à des tissus qui jusqu'à présent paraissaient peu transductibles par l'AAVr (Le Bec and Douar, 2006).

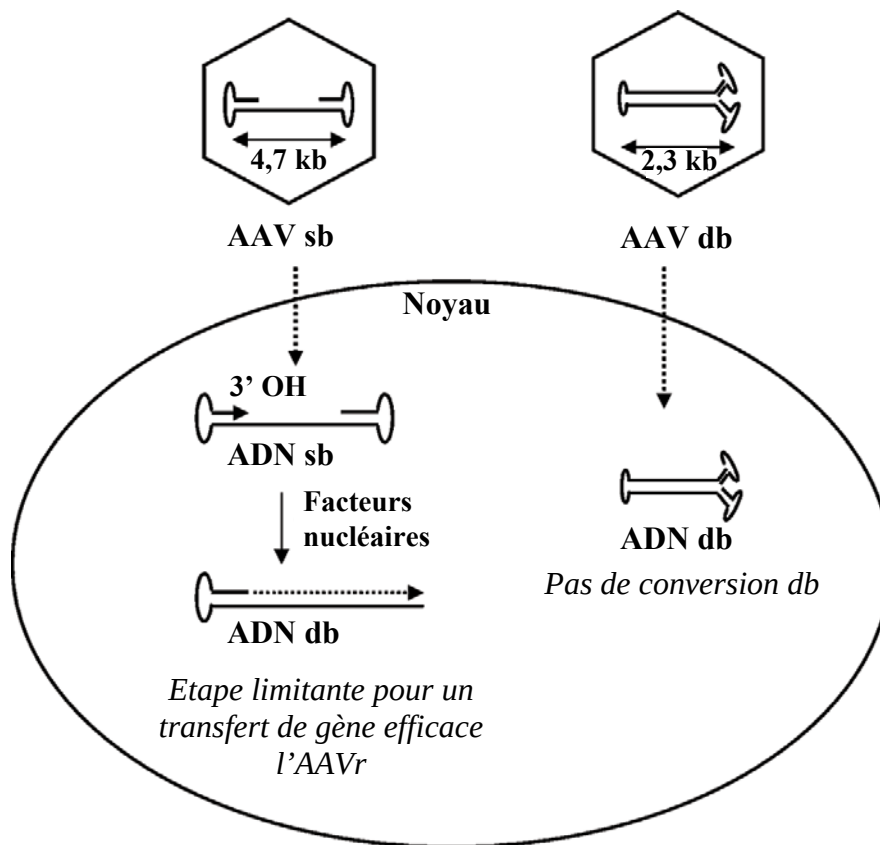
Figure 8 : Modèle de la formation du second brin de l'AAVr par appariement des génomes simple brin de polarité opposée



Adapté de Nakaï et al, 2000.

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

Figure 9 : Comparaison d'un AAV conventionnel avec un AAV véhiculant un ADN double brin



Adapté de Le Bec *et al*, 2006

Dans un AAVr conventionnel, la cassette d'expression est encadrée de deux ITR sauvages pour une taille totale de 4,7 kb. Dans un AAV double brin, un des ITR contient une délétion dans la séquence D, ou une mutation dans le site de résolution terminale ; cela aboutit à la formation d'un génome recombinant double brin de 2,3 kb. La conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin est une étape limitante dans le transfert de gène à l'aide d'AAVr. L'utilisation d'AAVr double brin permet d'éliminer cette étape de conversion.

sb, simple brin ; db, double brin.

3 Transfert de gène *in vivo* par les AAVr

3.1 Taille du génome encapsidé

Comme cela a été décrit précédemment, la taille du génome encapsidé dans les AAVr ne peut dépasser 4,6 kb. Cela ne constitue pas un obstacle majeur étant donné que 80% des ADNc ont une taille comprise entre 3 et 6 kb. Cependant certaines maladies, telles que la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne, l'hémophilie A, nécessitent l'utilisation de grands ADNc. Ces maladies font l'objet de nombreuses recherches et pour pouvoir utiliser l'AAVr dans leur traitement, il est nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies.

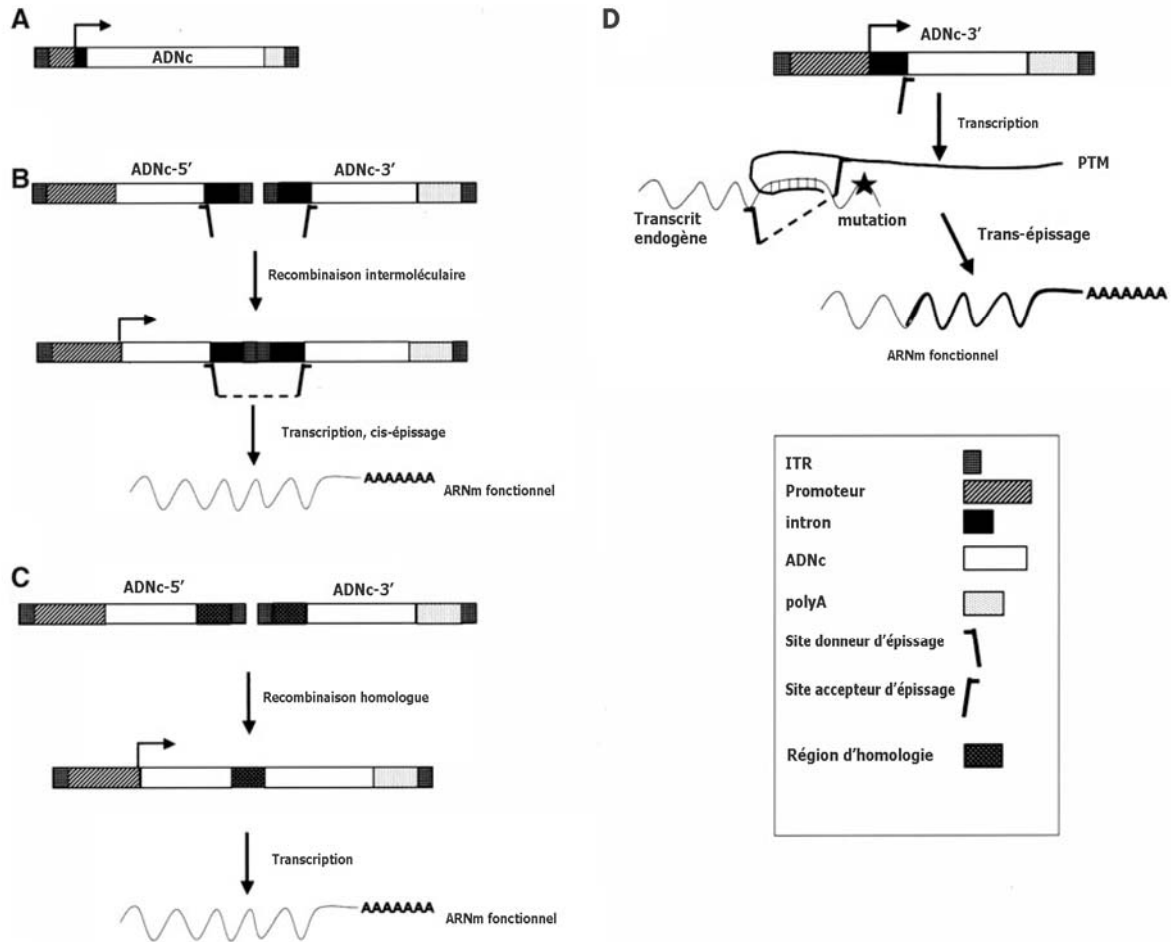
Une de ces stratégies consiste à apporter la séquence codante à l'aide de deux vecteurs AAVr. Un vecteur porte le promoteur, la portion 5' de l'ADNc, et un site donneur d'épissage et l'autre porte un site accepteur d'épissage, la portion 3' et le signal de polyadénylation (Nakai *et al.*, 2000a; Sun *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000) (figure 10.B). La présence d'un site donneur et d'un site accepteur d'épissage à une position appropriée permet la production d'un ARNm complet. Cette approche nécessite une co-administration efficace des deux vecteurs dans la même cellule. Ensuite la concatémérisation de ces deux génomes indépendants génère différents multimères : tête-tête, queue-queue ou tête-queue. Seule la position tête-queue permet de restaurer l'expression complète de la protéine désirée. L'étape limitante de cette stratégie semble être l'efficacité de la réaction d'épissage elle-même, plus que la co-infection (Xu *et al.*, 2004). Cette stratégie a été utilisée pour le facteur VIII dans le modèle de l'hémophilie A (Chao *et al.*, 2002). Les niveaux d'expression obtenus sont plus faibles que ceux obtenus avec une stratégie classique. Optimiser la nature du site donneur et du site accepteur d'épissage pourraient augmenter l'efficacité.

Une autre alternative est basée sur un système de recombinaison homologue entre deux séquences homologues positionnées pour l'une en 3' du premier vecteur, et pour l'autre en 5' du second vecteur (Duan *et al.*, 2001)(figure 10.C). Cette stratégie s'est révélée presque aussi efficace qu'un AAVr unique pour le transfert d'un gène rapporteur dans le poumon chez la souris (Halbert *et al.*, 2002).

Au lieu d'apporter l'ADNc complet, des stratégies consistant à corriger le gène défectueux ont également été développées. L'AAVr peut permettre de transférer dans une cellule une séquence d'ADN codant pour une molécule d'ARN appelée PTM (*Pre-trans-splicing protein*). Cette molécule est capable de se *trans*-épisser sur un messager endogène spécifiquement ciblé, de façon à y remplacer une séquence défectueuse par une séquence corrigée. La réaction de *trans*-épissage aboutira donc à la formation d'un ARNm codant une protéine fonctionnelle (figure 10.D). L'AAVr peut également apporter des ARN dont le rôle est de se fixer sur l'exon défectueux et ainsi empêcher son épissage. Il s'agit du saut d'exon ou *exon skipping* (Goyenvallé *et al.*, 2004). Cela aboutit à la formation d'une protéine tronquée mais fonctionnelle.

Une autre stratégie utilisée pour contourner le problème de la taille du génome pouvant être encapsidé, dans le cas d'ADNc de grandes tailles, est l'utilisation de minigènes. Cette approche consiste à utiliser un ADNc délété d'une partie de sa séquence mais permettant tout de même l'expression d'une protéine fonctionnelle. Des minigènes pouvant être encapsidés dans un AAVr ont ainsi été créés à partir de l'ADNc du gène CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) de 7,2 kb originellement (Ostedgaard *et al.*, 2005). La capacité de ces minigènes à restaurer une activité complète du CFTR n'est pour le moment pas connue. La réduction de la taille de l'ADNc encapsidé permet également de libérer de la place pour des éléments régulateurs, tels qu'un promoteur viral fort ou chimérique (Virella-Lowell *et al.*, 2005). De façon similaire des mini- (environ 6 kb) et microgènes (entre 3,1 et 4,2 kb) ont été développés à partir de l'ADNc de la dystrophine (14 kb). Ces derniers peuvent être véhiculés par des vecteurs AAVr et permettent une expression d'une dystrophine réduite, qui restaure les propriétés contractiles du muscle (Yoshimura *et al.*, 2004) (pour revue Le Bec and Douar, 2006).

Figure 10 : Stratégies pour contourner la limitation de la taille du génome encapsidé



Adapté de Warrington *et al*, 2006.

A. vecteur « traditionnel »

B. administration de deux vecteurs permettant l'expression du transgène après recombinaison intermoléculaire et cis-épissage

C. administration de deux vecteurs conduisant à l'expression du transgène après recombinaison homologue

D. vecteur exprimant une molécule de trans-épissage (PTM). Ce PTM peut s'hybrider au transcrit endogène et par la suite la réaction de trans-épissage aboutira à la formation d'un ARNm codant pour une protéine fonctionnelle.

3.2 Tropisme tissulaire

Chaque sérotype d'AAVr utilise une voie d'entrée spécifique dans la cellule réduisant ses capacités de transduction à certains types cellulaires. Le tropisme cellulaire et tissulaire de chaque sérotype a été étudié. Ces études utilisent pour la majorité des vecteurs hybrides, portant une cassette d'expression encadrée par les ITR de l'AAV2. Ainsi les différences d'efficacité de transduction observées entre les différents sérotypes d'AAVr ne peuvent être attribuées qu'à la capside. Nous ne tiendrons donc pas compte ici des ITR, mais seulement de la capside dans la numérotation des AAVr.

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

L'arrivée de nouveaux sérotypes a permis de définir, pour la majorité des organes, le sérotype optimal pour un transfert de gène efficace (Tableau II). De par son accessibilité, le muscle squelettique est une cible de choix en transfert de gène. L'AAVr 1 et l'AAVr 7 transduisent le muscle squelettique beaucoup plus efficacement que l'AAVr 2 lors d'injections intramusculaire (Gao *et al.*, 2004b). L'AAVr 6, dont la capside ne diffère que de six acides aminés de celle de l'AAVr 1 est également capable de transduire efficacement le muscle squelettique (Blankinship *et al.*, 2004). Lors d'une injection systémique, l'AAVr 8 se révèle être le sérotype le plus intéressant pour transduire le muscle squelettique. L'administration intravasculaire d'AAVr 8 à forte dose chez la souris permet de transduire la totalité des muscles squelettiques, incluant le diaphragme et le muscle cardiaque entier, ainsi qu'un certain nombre de cellules du pancréas, des muscles lisses et du cerveau (Nakai *et al.*, 2005). Une autre étude montre une transduction efficace du cœur et des muscles squelettiques chez la souris et le hamster après une injection systémique d'AAVr 8 (Wang *et al.*, 2005). L'AAVr 9 présente un tropisme similaire à celui de l'AAVr 2, avec toutefois une efficacité de transduction plus forte.

Tableau II : Sérotype optimal pour un transfert de gène efficace selon les organes

Tissu	Sérotype(s) optimal(aux)
Foie	AAV8, AAV9
Muscle squelettique	AAV1, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9
Système nerveux central	AAV1, AAV4, AAV5
Epithélium pigmentaire rétinien	AAV4, AAV5
Photorécepteurs	AAV5
Poumon	AAV9
Cœur	AAV8
Pancréas	AAV8
Rate	AAV2

Adapté de Wu *et al*, 2006

Le foie est un organe qui est également largement étudié comme cible pour le transfert de gène. L'AAVr est alors administré par voie intraportale. Si l'AAVr 6 permet de transduire le foie avec une efficacité supérieure à l'AAVr 2 et l'AAVr 1 (Grimm *et al.*, 2003), il semble que ce soit l'AAVr 8 qui permette d'obtenir les plus hauts niveaux d'expression du transgène dans le foie (Jiang *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2006)..

De nombreuses études ont également cherché à déterminer le sérotype optimal pour un transfert de gène dans le système nerveux central (SNC). Plusieurs sérotypes peuvent transduire les cellules nerveuses. Cependant le type cellulaire cible transduit varie en fonction du sérotype utilisé (cf. § transfert de gène dans le système nerveux central à l'aide d'AAVr). De façon générale, l'AAVr 1 et l'AAVr 5 montrent une meilleure efficacité de transduction dans le SNC par rapport à l'AAVr 2 et cela quelque soit le site d'injection intracérébral (Burger *et al.*, 2004). L'AAVr 4, quant à lui, transduit un type cellulaire spécifique : les cellules épendymaires (Davidson *et al.*, 2000). Dans la rétine, ce sérotype transduit exclusivement les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avec toutefois une efficacité moindre que l'AAVr 5 (Weber *et al.*, 2003).

Les cinétiques d'expression du transgène varient également en fonction des sérotypes. Ainsi, des cinétiques d'expression différentes ont été observées à la suite d'une administration intraportale de vecteurs AAVr 2, 6 et 8. L'expression du transgène augmente lentement dans les semaines suivant l'injection avec l'AAVr 2 pour atteindre un niveau maximum entre 6 et 8 semaines post-injection. Au contraire, l'expression du transgène est plus rapide et atteint son pic quatre semaines après l'administration avec l'AAVr 6 et l'AAVr 8 (Thomas *et al.*, 2004) (Wu et Samulski données non publiées) (pour revue Wu *et al.*, 2006a).

3.3 Altération du tropisme de l'AAVr

Malgré la caractérisation de nouveaux sérotypes, la création de nouveaux AAV reste un axe de recherche important, notamment pour cibler spécifiquement un tissu ou encore pour permettre la transduction de type cellulaire peu ou pas transductibles jusqu'à présent. Deux types de vecteurs ont ainsi été développés : les vecteurs mosaïques et les vecteurs chimériques.

3.3.1 Les vecteurs mosaïques

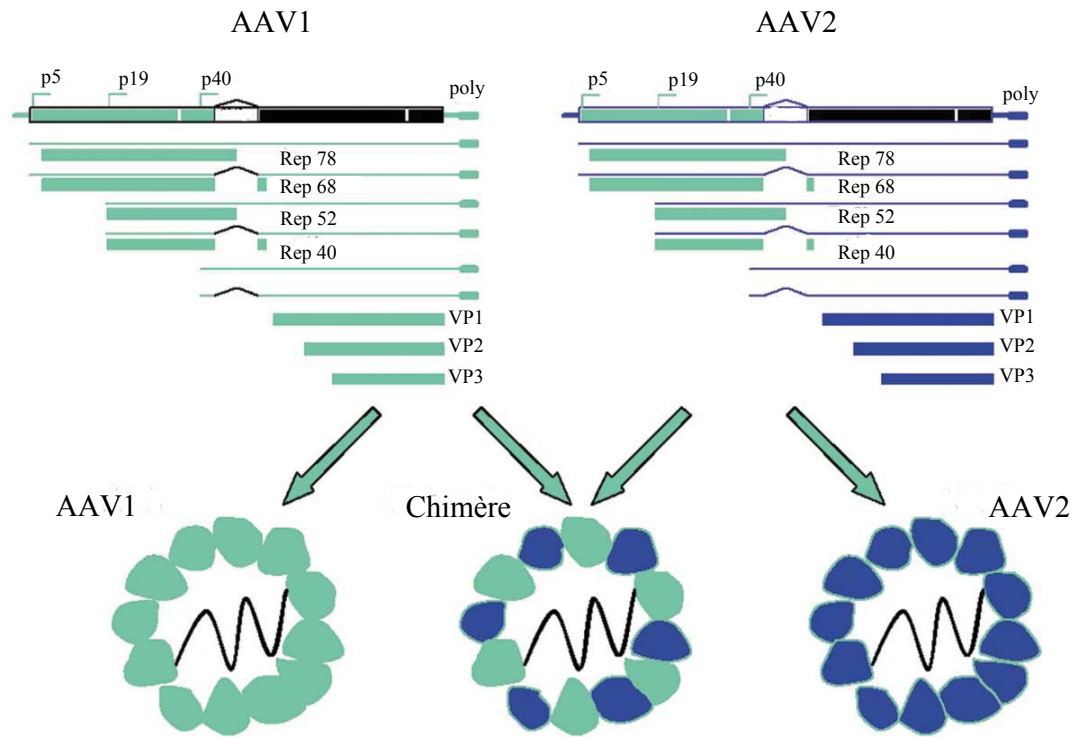
Pour générer ces vecteurs, une des stratégies consiste à insérer la séquence codante d'un peptide ou d'une protéine ligand dans le cadre ouvert de lecture des gènes cap de l'AAV2 de façon à cibler un type cellulaire spécifique (Bartlett *et al.*, 1999; Ponnazhagan *et al.*, 2002; Ried *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003; Perabo *et al.*, 2003). Bien que cette stratégie ait montré une certaine efficacité, la modification de la capside de l'AAV2 résulte souvent en une réduction significative du titre en particules et du nombre de cellules transduites ; en particulier lorsqu'un ligand de grande taille est introduit dans la capside. Il est possible cependant d'améliorer l'infectiosité et le titre de la préparation virale, en générant un vecteur AAVr 2 présentant, à la fois, des protéines VP sauvages et des protéines VP modifiées par un ligand (Gigout *et al.*, 2005). Un vecteur AAVr 2 présentant une capside constituée de protéines sauvages et de protéines VP2 modifiées, par insertion dans leur partie N-terminale d'un anticorps dirigé contre le CD34 permet de transduire des cellules CD34+ (Yang *et al.*, 1998).

Ces vecteurs pourraient être particulièrement intéressants dans le cadre du transfert de gène en cancérologie. Ils pourraient permettre de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses via le ciblage d'un antigène tumoral, et d'y transférer spécifiquement un gène suicide.

3.3.2 Les vecteurs chimériques

Un vecteur chimérique est un vecteur dont la capside est constituée de protéines VP de deux sérotypes différents. Les vecteurs sont produits par tritransfection de cellules 293 avec un plasmide apportant les fonctions adénovirales et deux plasmides portant les gènes rep-cap de chaque sérotype apportés à des ratios variables (figure 11). Des vecteurs chimères de sérotypes 1 et 2 ont été produits (Hauck *et al.*, 2003). Ces vecteurs peuvent être inhibés par les anticorps neutralisants des deux sérotypes, prouvant ainsi qu'ils ont incorporés des protéines de capside des deux sérotypes. Ces vecteurs chimères combinent les avantages des deux sérotypes. Ils peuvent être purifiés sur colonne d'héparine, grâce à l'incorporation de VP d'AAV2. *In vivo*, ils présentent un taux de transduction similaire à celui de l'AAVr 1 dans le muscle et à celui de l'AAVr 2 dans le foie.

Figure 11 : Production d'un vecteur AAVr chimérique



Adapté de Hauck *et al*, 2003.

Production de vecteur AAV recombinant chimérique basé sur l'AAV1 et l'AAV2. Les génomes de l'AAV1 et de l'AAV2 ainsi que les protéines exprimées sont représentés par des couleurs différentes (vert et bleu respectivement).

Des vecteurs chimères de plusieurs autres sérotypes ont par la suite été développées (Rabinowitz *et al.*, 2004). Leur production a nécessité la combinaison de paires de plasmides rep-cap des sérotypes 1 à 5. Ces plasmides ont été transfectés à des ratios variables (19:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:19). L'incorporation de VP d'un autre sérotype change l'affinité des vecteurs pour certains substrats. Ainsi, l'incorporation de VP de sérotype 2 ou 3 dans des capsides d'AAVr1 permet d'augmenter l'affinité à l'héparine. Inversement, des quantités croissantes de VP de sérotype 5 dans des capsides de sérotype 2 ou 3 diminuent considérablement la fixation à l'héparine mais augmente la fixation à la mucine. Le virion mature présente des caractéristiques des deux sérotypes, de façon plus ou moins importante selon les ratios de plasmides utilisés. De plus les qualités des deux sérotypes peuvent s'additionner ou même avoir un effet « synergique » lors de test de transduction. C'est le cas des vecteurs chimères 1/2 (pour des ratios 1:3, 1:19) qui présentent un taux de transduction 4 fois plus élevé que l'AAVr 2 et 20 fois plus élevés que l'AAVr 1 sur des cellules C2C12 (cellules musculaires murines).

3.4 Immunogénicité des AAVr

Les vecteurs AAV ne sont que faiblement immunogènes, ce qui permet, dans la plupart des cas, d'obtenir une expression à long terme du transgène. Cependant, bien que la réponse immune suite à l'injection d'AAVr soit faible, elle n'est pas inexistante, et peut même jouer un rôle critique dans le transfert de gène *in vivo*. La réponse immunitaire de l'hôte peut être dirigée contre la capside du vecteur et/ou le produit d'expression du transgène (Jooss and Chirmule, 2003).

3.4.1 Réponse immunitaire dirigée contre la capside de l'AAV

Dans la population humaine, la présence dans le sérum d'anticorps dirigés contre l'AAV1, 2, 3 et 5 n'est pas rare ; les anticorps dirigés contre l'AAV2 étant les plus fréquents. La prévalence de ces anticorps varie avec l'âge et la localisation géographique (Blacklow *et al.*, 1968; Blacklow *et al.*, 1971; Georg-Fries *et al.*, 1984; Erles *et al.*, 1999). Trente-cinq à 80% de la population humaine présente des anticorps dirigés contre l'AAV2 sauvage dont la majorité sont des anticorps neutralisants (Erles *et al.*, 1999). L'existence de cette pré-

immunité dans la population humaine peut constituer un obstacle majeur pour un transfert de gène efficace avec des vecteurs AAVr. Plusieurs stratégies ont été développées afin d'éliminer cette réponse humorale dirigée contre la capsid du vecteur.

3.4.1.1 Altérations de la capsid de l'AAV

Les anticorps dirigés contre la capsid de l'AAVr 2 ont été caractérisés (Wistuba *et al.*, 1997), et les domaines de la capsid présentant les principaux épitopes immunogènes ont été identifiés (Moskalenko *et al.*, 2000; Wobus *et al.*, 2000). La modification de ces épitopes permet de diminuer l'immunogénicité de l'AAVr (Huttner *et al.*, 2003). Six AAVr mutants ont ainsi été créés. Pour deux d'entre eux, l'affinité des anticorps dirigés contre la capsid de l'AAVr est réduite de plus de 70% par rapport à l'AAV sauvage.

3.4.1.2 Utilisation de sérotypes différents

A ce jour, il existe onze sérotypes qui sont fonctionnellement et structurellement différents de l'AAV2. Une pré-immunité contre ces sérotypes est faible dans la population humaine. Les anticorps neutralisants dirigés contre la capsid de l'AAV7 et de l'AAV8 sont rares, puisque ces 2 AAV sont d'origine simienne. De plus ils ne sont pas inhibés par les anticorps neutralisants d'autres sérotypes (Gao *et al.*, 2002). Une autre étude effectuée sur 85 patients sains, montre une séronégativité totale pour l'AAV5, suggérant qu'une immunité pré-existante ne sera pas un problème dans le cadre d'applications utilisant ce sérotype (Hildinger *et al.*, 2001).

Au moins certains de ces onze sérotypes semblent être moins immunogènes que l'AAVr 2. Ainsi à la différence de l'AAVr 2, l'AAVr 6 peut être réadministré dans le poumon de souris sans qu'une forte réaction immunologique inhibant la transduction ne soit induite (Halbert *et al.*, 1998). De plus la transduction n'est pas inhibée si un autre sérotype est utilisé lors de la seconde administration. L'immunogénicité accrue de l'AAV2 s'explique en partie par une décapsidation lente, conduisant à une présentation des peptides de la capsid par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sur des périodes prolongés (Hauck *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004).

Une autre étude de transfert de gène dans le cerveau de rat (Mastakov *et al.*, 2002b) a montré qu'il était possible de réadministrer le même vecteur AAVr dans le système nerveux central si l'intervalle séparant les 2 injections était supérieur à 4 semaines. Cet intervalle peut être réduit à 2 semaines si la cassette d'expression utilisée est différente lors de la seconde injection.

3.4.1.3 Mise en place d'un traitement immunosuppresseur lors de la première administration d'un AAVr

Une autre stratégie utilisée pour faciliter l'administration répétée d'un vecteur AAVr consiste à mettre en place un traitement immunosuppresseur transitoire lors de la première exposition au vecteur (Halbert *et al.*, 1998). Ainsi l'établissement d'un traitement immunosuppresseur, basé sur l'administration d'un anticorps anti CD4, lors de la première injection d'un vecteur AAVr dans le muscle de souris permet une expression du transgène à la suite de la seconde administration (Manning *et al.*, 1998). Cependant ce traitement n'est efficace que dans le cadre d'animaux naïfs, c'est-à-dire ne présentant pas naturellement une pré-immunité contre le vecteur. Une immunosuppression transitoire mise en place au moment de la seconde administration d'un vecteur codant le facteur IX humain ne permet pas l'expression du transgène (Moskalenko *et al.*, 2000), alors que des souris contrôles naïves expriment cette protéine après injection de ce même AAVr (Zaiss and Muruve, 2005).

3.4.2 Réponse immunitaire dirigée contre le transgène

Dans divers modèles animaux et essais cliniques, une expression à long terme du transgène a été décrite suite à un transfert de gène médié par l'AAV (Herzog *et al.*, 1997; Greelish *et al.*, 1999; Herzog *et al.*, 1999; Snyder, 1999; Wang *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2000). Dans ces études, aucune réponse immunitaire contre le transgène n'avait été observée. Cependant l'association de certains transgènes avec un tissu cible particulier peut conduire à l'activation d'une réponse immune cellulaire et humorale dirigée contre le produit d'expression du transgène (Fields *et al.*, 2000; Favre *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2002). Récemment une réponse auto-immune a été décrite chez des macaques *cynomolgus* suite à un transfert de gène médié par l'AAV (Chenuaud *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2004a). Dans ces deux

études des macaques ayant reçu une injection intramusculaire d'AAVr portant l'ADNc de l'erythropoïétine (Epo) de macaques ont développé une réponse immunitaire dirigée à la fois contre l'Epo transgénique et l'Epo endogène. La réponse immunitaire contre le produit du transgène dépend de plusieurs facteurs : du fond génétique de l'hôte, de l'immunogénicité du produit de transgène, du promoteur permettant son expression, de la voie d'administration et de la dose de vecteur injecté (Sun *et al.*, 2003; Zaiss and Muruve, 2005). Autant de facteurs à prendre en compte si l'on veut éviter le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit de transgène.

3.4.2.1 Prédilection génétique

Le fond génétique peut influencer l'efficacité du transfert de gène. Une étude a analysé la réponse humorale dirigée contre la capsid ainsi que l'expression du transgène chez 12 lignées différentes de souris après injection intramusculaire d'un vecteur AAVr 2 (Zhang *et al.*, 2004). Toutes les souris immunocompétentes ont développé une réponse immunitaire dirigée contre la capsid. Certaines lignées de souris, présentant une prédisposition génétique à l'auto-immunité, ont développé en plus une réponse immunitaire forte contre le produit d'expression du transgène.

3.4.2.2 Immunogénicité du transgène

La réponse immunitaire développée dépend également du transgène exprimé. Une réponse immunitaire forte est générée si le produit d'expression du transgène est considéré comme étranger par l'organisme. L'existence de modèles animaux pour la plupart des maladies génétiques humaines a permis de mieux caractériser et anticiper ces réponses immunes dirigées contre le produit du transgène. Les modèles animaux existants sont soit naturellement atteints d'une maladie semblable à celle de l'homme, soit il s'agit de souris dont on a modifié le génome pour mimer une pathologie humaine. Par exemple, plusieurs modèles animaux ont été développés pour l'hémophilie B. L'hémophilie B est une maladie caractérisée par un désordre de la coagulation dû au déficit d'un facteur de coagulation, le facteur IX (FIX). Deux types de mutations ont été décrites chez ces animaux : faux-sens ou non-sens. Dans les deux cas, aucun FIX n'est détecté dans le plasma. La mutation non-sens

entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré et un ARNm instable, alors qu'avec la mutation faux-sens une protéine non fonctionnelle est produite. Herzog et ses collaborateurs ont montré une expression stable et à long terme du facteur IX après injection intramusculaire dans le modèle canin présentant la mutation faux sens, avec une réponse immunitaire contre le facteur IX absente ou transitoire (Herzog *et al.*, 1999). En revanche, les chiens portant la mutation non-sens ont développé une réponse immunitaire forte contre le facteur IX à la suite du transfert de gène. L'apparition d'anticorps anti-FIX peut cependant être évitée chez ces chiens en administrant un traitement immunosuppresseur au moment de l'injection (Herzog *et al.*, 2001).

La réponse immunitaire semble également être influencée par la quantité de produit de transgène synthétisé par les cellules transduites. Une faible expression de la protéine ou l'utilisation de promoteurs inductibles ou spécifiques de la cellule cible permet plus facilement d'échapper aux systèmes immunitaires de l'hôte (pour revue Zaiss and Muruve, 2005).

3.4.2.3 Dose de vecteur injecté et voie d'administration

Ces deux facteurs peuvent moduler la réponse immune contre le produit d'expression du transgène. La réponse immunitaire est dose dépendante (Herzog *et al.*, 2002). Sept chiens atteints d'hémophilie B ont été injectés intramusculairement par un AAVr 2 portant l'ADNc du facteur IX canin à différentes doses. Une dose de vecteur de 2.10^{12} particules par site induit seulement une réponse humorale transitoire, alors qu'une dose 6 fois plus forte induit une réponse humorale forte et prolongée. L'apparition d'anticorps anti-FIX a pu être efficacement bloquée chez un chien ayant reçu les plus fortes doses de vecteur en lui administrant parallèlement un traitement immunosuppresseur.

La voie d'administration du vecteur peut également avoir un profond impact sur l'induction d'une réponse immune contre le produit du transgène et donc sur l'efficacité du transfert de gène. Le développement d'une réponse immunitaire humorale contre le facteur IX humain est décrit chez la souris après injection intramusculaire d'un AAV2 –FIX, alors que l'injection dans le foie de ce même vecteur n'induit aucune réponse immunitaire contre le transgène (Ge *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001a). Ces résultats suggèrent que le seuil d'induction

d'une réponse humorale contre le produit du transgène varie selon la voie d'administration. Egalement dans le cas du facteur IX, son site naturel de production est le foie. Il est donc possible qu'une production ectopique (ici dans le muscle) aboutisse à des modifications post-traductionnelles inadéquates générant de nouveaux épitopes immunogéniques (pour revue Sun *et al.*, 2003).

3.5 Les essais cliniques

Bien que certaines réactions immunologiques soient apparues, les résultats encourageants obtenus par transfert de gène avec l'AAVr dans un certain nombre de modèles animaux ont permis le développement d'essais cliniques (Tableau III). Ces protocoles cliniques concernent en majorité des maladies monogéniques. Jusqu'à aujourd'hui, les deux maladies les plus proches du développement clinique sont la mucoviscidose et l'hémophilie B. La majorité des essais cliniques développés se trouvent actuellement en phase I et utilisent principalement l'AAV2 comme vecteur. Bien que ce sérotype ne soit pas le plus optimal pour obtenir une transduction efficace de bon nombre d'organes, c'est actuellement le sérotype qui a été le mieux étudié, car caractérisé en premier. De plus, l'AAVr 2 peut être produit et purifié selon des conditions GMP (*Good Manufacturing Procedure*) compatibles avec une administration chez l'homme.

3.5.1 La mucoviscidose

Les essais cliniques les plus avancés à ce jour dans l'utilisation d'AAVr concernent le traitement de la muscoviscidose. Environ 200 patients ont été traités à ce jour grâce à un transfert de gène médié par un AAVr.

La mucoviscidose est la maladie génétique mortelle la plus fréquente dans la population Caucasienne. C'est une maladie autosomique récessive, due à une mutation du gène codant pour le CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane regulator*) et localisé sur le chromosome 7. La protéine CFTR est une protéine « canal » régulée par l'AMPc et impliquée dans la réabsorption des ions chlorures et dans la régulation du potentiel transmembranaire au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales (Welsh and Smith, 1993; Wagner *et al.*,

2002). Les symptômes et notamment le déficit respiratoire observés sont dus à une inflammation de l'épithélium respiratoire, compliquée par des infections microbiennes, l'ensemble conduisant à une destruction progressive du poumon avec fibrose.

Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont été initiés dans le traitement de cette maladie en utilisant un vecteur AAVr 2 portant l'ADNc entier du CFTR humain et où l'ITR est utilisé comme promoteur (Flotte *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1998a; Wagner *et al.*, 1998b; Wagner *et al.*, 1999; Aitken *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2002; Flotte *et al.*, 2003). Les résultats de ces différents essais cliniques ont démontré qu'un transfert de gène sécurisé est possible dans l'épithélium nasal, sinusal et bronchique, résultant en une correction partielle du défaut électrophysiologique et de la réponse inflammatoire (Flotte, 2005; Warrington and Herzog, 2006). Cependant ce transfert de gène est transitoire dans le poumon. Des sérotypes alternatifs sont étudiés pour essayer d'augmenter l'efficacité de transduction, de même que des systèmes intégratifs. Un essai de phase II en double aveugle a ainsi été initié pour déterminer la sécurité et la tolérance à des administrations répétées d'AAVr 2-CFTR par nébulisation (Moss *et al.*, 2004). Les patients ont reçu 3 nébulisations à un mois d'intervalle d'un placebo ou du vecteur AAV2-CFTR (1.10^{13} particules totales par inhalation). Cette étude a montré que des administrations répétées d'AAVr 2-CFTR étaient bien tolérées par les patients et permettaient une amélioration des fonctions pulmonaires. Des anticorps neutralisants anti-AAVr 2 ont été détectés chez ces patients mais sans effet négatif sur le traitement.

3.5.2 L'hémophilie B

Le transfert de gène visant à traiter l'hémophilie B a fait l'objet de nombreuses études durant ces 10 dernières années. L'hémophilie B est une maladie liée au chromosome X et causée par la mutation du gène codant pour le facteur IX. La sévérité de l'hémophilie est corrélée avec le niveau de facteur IX circulant. Les patients avec moins de 1% de facteur IX circulant sont atteints d'une forme sévère se caractérisant par des hémorragies spontanées et des saignements prolongés suite à un traumatisme ou une chirurgie. Une augmentation de la concentration en facteur IX correspondant à 5% du taux normal circulant permet une nette amélioration des symptômes (Lofqvist *et al.*, 1997; Ljung, 1998).

Tableau III : Résumé des essais cliniques en cours utilisant l’AAVr

Maladie	Transgène	Sérotype	Voie d’administration	Cellule cible	Essais cliniques
Déficiencie en α_1 -antitrypsine	α_1 -Antitrypsine	AAV2, AAV1	Intramusculaire	Fibres muscle squelettique	Phase I/II
Maladie d’Alzheimer	Facteur de croissance des nerfs	AAV2	Intracranial ou ex-vivo	Neurones	Phase I/II
Maladie de Canavan	Aspartoacylase	AAV2	Intracranial	Neurones	Phase I
Mucoviscidose	CFTR	AAV2	Epithélium nasal et bronchial	Cellules épithéliales pulmonaires	Phase I, Phase II
Hémophilie B	Facteur IX	AAV2	Intramusculaire	Fibres muscle squelettique	Phase I/II
Hémophilie B	Facteur IX	AAV2	Artères hépatiques	Hépatocytes	Phase I/II
Amaurose congénitale de Leber	RPE 65	AAV2	Espace sous-rétinien	Photorécepteurs	Phase I/II approuvée
Maladie de Parkinson	L-DOPA-décarboxylase	AAV2	Intracranial	Neurones	Phase I
Dystrophie musculaire	Micro-dystrophine	AAV1/2	Intramusculaire	Fibres muscle squelettique	Phase I initié
Maladie de Parkinson	Décarboxylase de l’acide glutamique	AAV2	Intracranial	Neurones	Phase I

Adapté de Warrington *et al*, 2006

Deux voies d'administration (intraportale ou intramusculaire) du vecteur AAVr 2-FIX ont été étudiées dans les modèles murins et canins. Des essais cliniques se basant sur ces deux stratégies ont été développés

Des adultes atteints d'hémophilie sévère présentant une mutation faux sens ont reçu plusieurs injections intramusculaires d'AAV2-FIX lors d'un essai clinique de phase I (Manno *et al.*, 2003). Chaque patient a reçu des doses différentes de vecteur variant entre $2 \cdot 10^{11}$ particules /kg à $1,8 \cdot 10^{12}$ particules par kg. Chez tous les patients, cette étude a montré un transfert de gène dans le muscle squelettique et cela même si les patients étaient pré-immunisés contre l'AAV2. Cependant, quelque soit la dose de vecteurs, la concentration en facteur IX est toujours restée inférieure au seuil thérapeutique. L'utilisation de sérotypes alternatifs ou une augmentation de la dose injectée associée à une immunosuppression, ou encore une administration vasculaire du vecteur sont actuellement en cours d'étude afin d'améliorer cette stratégie de traitement de l'hémophilie B (pour revue Warrington and Herzog, 2006).

L'autre alternative pour traiter l'hémophilie B est l'administration intraportale d'AAV-FIX. Un essai clinique de phase I/II a été initié sur des patients atteints d'hémophilie sévère (Manno *et al.*, 2006). Différentes doses de vecteur AAV2-FIX ont été administrées dans l'artère hépatique de ces patients. Cette procédure n'a été associée à aucune toxicité. Des niveaux thérapeutiques de facteur IX ont été obtenus pour les doses les plus fortes. Cependant cette expression n'a duré que 8 semaines. Cette perte d'expression serait due à une réponse cellulaire contre la capside de l'AAV2. Dans des études futures, un traitement immunosuppresseur sera à mettre en place pour permettre une expression à long terme du transgène thérapeutique.

IV TRANSFERT DE GENE DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL (SNC) A L'AIDE D'AAVr

L'AAVr semble être le candidat idéal pour permettre un transfert de gène efficace et sans toxicité, puisqu'il peut transduire des cellules qui ne se divisent pas (telles que les neurones) et qu'aucune pathogénicité ne lui est associée.

1 Expression d'un transgène médiée par un AAVr dans le SNC

Toutes les études *princeps* du transfert de gène dans le SNC ont été établies en utilisant un vecteur AAVr 2 contenant le promoteur fort du cytomégalo virus (CMV). Ces premières études ont montré qu'il était possible d'obtenir un transfert de gène efficace des neurones sans toxicité dans le SNC de rongeurs (Kaplitt *et al.*, 1994; Lo *et al.*, 1999). Cependant une diminution drastique de l'expression du transgène a été observée dans chacune de ces études quelques mois post-injection. La persistance d'expression du transgène varie selon les régions du cerveau (McCown *et al.*, 1996). La diminution de l'expression du transgène observée dans toutes ces études est vraisemblablement liée à l'extinction de l'activité du promoteur CMV par hyperméthylation (Prosch *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1999). Cette observation a conduit à la recherche d'autres promoteurs permettant un transfert de gène stable dans le SNC.

1.1 Utilisation de promoteurs spécifiques

Au contraire du promoteur CMV, le promoteur endogène NSE (*Neuron Specific Enolase*) permet de hauts niveaux d'expression du transgène, stables et à long terme, dans l'encéphale (Klein *et al.*, 1998) et la moelle épinière (Peel *et al.*, 1997). Un autre promoteur neuronal est le promoteur PDGF- β . Le PDGF (*platelet-derived growth factor*), facteur de croissance dérivé des plaquettes, est une protéine mitogénique et chimioattractante ubiquitaire. La caractérisation de ce facteur de croissance a montré que la chaîne β de cette protéine était exclusivement exprimée dans les neurones (Sasahara *et al.*, 1995). L'injection

d'un AAVr contenant le promoteur de la chaîne β du PDGF permet une expression forte et stable du transgène dans les neurones, comme le promoteur NSE (Peel and Klein, 2000). Le dernier promoteur neuronal à avoir été testé est celui du gène de la synapsine 1 humaine (hSYN). L'injection d'un AAV2 portant ce promoteur dans le SNC de rats a montré une expression du transgène principalement localisée dans les neurones (Kugler *et al.*, 2003). Le seul avantage de ce promoteur par rapport à ceux cités précédemment est sa petite taille. En effet, ce promoteur a une taille de 480 pb alors que le promoteur NSE a une taille de 1800 pb et le promoteur PDGF- β une taille de 1500 pb. L'utilisation de ce promoteur permet donc un gain de place dans un vecteur AAV où la taille du génome encapsidé est limitée.

D'autres promoteurs spécifiques de cellules non neuronales ont été testés. La protéine gliale fibrillaire acide (GFAP, *Glial fibrillary acidic protein*) est une protéine abondante dans les astrocytes matures. Elle est surexprimée dans les astrocytes activés en réponse à une lésion cérébrale. L'injection d'un AAVr portant le promoteur GFAP permet une transduction plus élevée des astrocytes au niveau du site d'injection comparé aux 1% d'astrocytes transduits avec un AAVr-CMV (Kaplitt *et al.*, 1994; McCown *et al.*, 1996; Mandel *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1998). De manière surprenante, ce promoteur permet également une expression du transgène dans les neurones (Peel and Klein, 2000).

Le promoteur de la protéine basique de la myéline (MBP, *Myelin Basic Protein*) a également été utilisé en transfert de gène avec l'AAVr. Cette protéine est produite dans le SNC par les oligodendrocytes et dans le système nerveux périphérique (SNP) par les cellules de Schwann. L'injection d'un vecteur AAVr 2 portant le promoteur MBP dans le corps calleux de souris génère de forts niveaux d'expression de la GFP sur plus de 3 mois. Les cellules transduites ont été identifiées comme étant des oligodendrocytes. A la différence, l'injection d'un vecteur AAVr-CMV ne permet qu'une faible expression du transgène dans la substance blanche

1.2 Utilisation de promoteurs hybrides

Ces promoteurs associent le promoteur CMV avec un autre promoteur, permettant ainsi d'empêcher l'extinction de l'activité transcriptionnelle observée avec le promoteur CMV seul. Le promoteur hybride CMV/ β -globine humaine a permis une expression à long terme du

transgène (1 an) (Mandel *et al.*, 1998). De même une expression du transgène pendant 7 mois a été notée avec le promoteur CMV/ β -actine de poulet dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Niwa *et al.*, 1991).

1.3 Utilisation de la séquence WPRE

Le Woodchuck hepatitis virus contient un élément de régulation post-transcriptionnelle, la séquence WPRE. Cette séquence est nécessaire pour l'accumulation cytoplasmique d'ARN viraux (Donello *et al.*, 1998). Elle permet d'augmenter l'expression du transgène dans des cellules en culture transfectées et infectées lorsqu'elle est incorporée dans la séquence 3' non traduite (Loeb *et al.*, 1999; Zufferey *et al.*, 1999). La séquence WPRE associée au promoteur PDGF- β permet une expression stable de la GFP pendant 41 semaines dans les neurones dopaminergiques et leurs projections après injection dans le striatum de rats (Paterna *et al.*, 2000). L'association du WPRE au promoteur PDGF- β augmente de 1,8 fois le nombre de neurones dopaminergiques transduits. L'association de la séquence WPRE avec le promoteur NSE permet une expression stable du transgène pendant 15 mois dans le striatum. L'expression du transgène est augmentée dans toutes les régions du cerveau injectées, de 14 fois dans le striatum, 47 fois dans l'hippocampe, 6 fois dans le cortex et 3 fois dans la substance noire (Xu *et al.*, 2001b).

1.4 Régulation de l'expression du transgène *in vivo*

Toutes ces études ont montré qu'il était possible d'obtenir une expression forte et à long terme d'un transgène dans le SNC après injection intracérébrale d'un AAVr. Cependant l'expression constitutive et à haut niveau d'une protéine thérapeutique peut avoir des effets secondaires indésirables, notamment dans le cas de facteurs de croissance. La régulation de l'expression du gène par la prise orale d'une drogue peut permettre de contrôler l'expression de la protéine au cours du temps et d'éviter les éventuels effets secondaires liés à une expression constitutive. Plusieurs systèmes de régulation sont utilisés : la tétracycline et son dérivé doxycycline (Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995), l'ecdysone (No *et al.*, 1996), le mifepristone (Wang *et al.*, 1994), et la rapamycine (Rivera *et al.*, 1996). Ces systèmes sont basés sur l'utilisation de facteurs de transcription chimérique. Ces complexes,

en se fixant sur des séquences opératrices spécifiques, clonées en amont d'un promoteur, permettent d'activer l'expression du transgène. La fixation ou non de ces facteurs de transcription est dépendante d'une drogue qui peut être administrée oralement. Le système tétracycline est le plus utilisé pour réguler l'expression d'AAVr dans le SNC. Il présente deux avantages : tout d'abord la petite taille de la séquence opératrice et de celle de l'inducteur (2,1 kb) permettant de laisser suffisamment de place pour incorporer un gène thérapeutique ; et également la capacité de la tétracycline et de ses dérivés à traverser la barrière hémato-encéphalique.

La condition préalable à l'utilisation de système de régulation est l'absence d'expression incontrôlée du transgène. En position *off*, l'expression du transgène doit être complètement éteinte. La possibilité de réguler l'expression d'un gène dans le SNC en utilisant le système tétracycline a été démontrée pour la première fois en 1998 (Haberman *et al.*, 1998). Ils ont observé, cependant, une expression basale du transgène en position *off*. Par la suite, ils ont montré que cette expression en l'absence d'activateur transcriptionnel était probablement due à une activité promotrice et *enhancer* des ITR de l'AAV2 (Haberman *et al.*, 2000). Différentes cassettes d'expression ont été testées afin de résoudre ce problème d'expression basale. En effet cette fuite d'expression peut être dramatique dans le cas où une expression même faible de la protéine peut être toxique pour la cellule. Au contraire si de forts niveaux d'expression du gène sont nécessaires à l'obtention d'une activité biologique, une expression basale du transgène ne sera pas problématique. La nature du gène thérapeutique utilisé détermine le niveau de régulation acceptable pour chaque application (Burger *et al.*, 2005; McCown, 2005).

2 Tropisme cellulaire dans le système nerveux central

L'AAVr 2 a été le sérotype le plus utilisé en transfert de gène dans le SNC. Il transduit principalement les neurones (McCown *et al.*, 1996; Peel *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Mandel *et al.*, 1998). Il peut également transduire d'autres types cellulaires non neuronales (comme les astrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales) mais avec une efficacité plus faible (Kaplitt *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2000; Cucchiaroni *et al.*, 2003). L'AAVr 2 transduit efficacement les neurones dans un certain nombre de structures cérébrales, incluant la substance noire (Mandel

et al., 1997; Klein *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004), le striatum (Burger *et al.*, 2004; Hadaczek *et al.*, 2004) et le pallidum (Tenenbaum *et al.*, 2000). Dans l'hippocampe il transduit préférentiellement le gyrus denté, avec une faible transduction dans les régions CA1 et CA3 (Burger *et al.*, 2005). L'AAVr 2 peut transduire les cellules épendymaires après une injection intraventriculaire chez la souris (Davidson *et al.*, 2000). D'autres sérotypes ont montré leur capacité à transduire efficacement le système nerveux central. Ces études ont été effectuées avec des vecteurs AAVr hybrides présentant une cassette d'expression encadrée par les ITR de l'AAV2 encapsidée dans les capsides des différents sérotypes (1, 5, 4, 6, 7, 8, 9 et 10).

Les vecteurs AAVr de sérotype 1 et 5 montrent une meilleure distribution dans le SNC et le nombre de neurones transduits est plus élevé qu'avec l'AAVr 2 (Alisky *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Passini *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004). Ils peuvent également transduire les cellules épendymaires chez la souris adulte et nouveaux-nés après une injection intraventriculaire (Davidson *et al.*, 2000; Passini and Wolfe, 2001; Passini *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 2005). Ces deux sérotypes montrent une meilleure efficacité de transduction et des niveaux d'expression du transgène plus forts que l'AAVr 2 dans le striatum, l'hippocampe, le globus pallidus, la substance noire, la moelle épinière et le cervelet (Alisky *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004). Dans la substance noire, l'AAVr 2 ne transduit que la *pars compacta*, alors que l'AAVr 1 et l'AAVr 5 peuvent transduire la *pars compacta* et la *pars reticulata* (Burger *et al.*, 2004). Dans l'hippocampe la transduction par l'AAVr 2 est limitée à la région hilare, alors que les AAVr 1 et AAVr 5 transduisent également les neurones pyramidaux de la région CA1 et CA3 (Di Pasquale *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004; Richichi *et al.*, 2004; Klugmann *et al.*, 2005) (pour revue Burger *et al.*, 2005). Ces deux sérotypes sont également capables de transduire des astrocytes à proximité et à distance du site d'injection (Davidson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). L'efficacité de transduction de l'AAVr 1 est 13 à 35 fois plus forte que l'AAVr 2 dans le striatum de souris (Wang *et al.*, 2003). Une étude effectuée dans le cerveau de chat, montre que l'AAVr 1 peut transduire la substance grise, mais également la substance blanche, notamment les oligodendrocytes (Vite *et al.*, 2003). De manière surprenante, cette même étude montre une absence de transduction avec l'AAVr 5 dans le cerveau de chat. Il semblerait donc qu'il y ait une variabilité entre les espèces.

Le tropisme de l'AAVr 4 a également été étudié dans le système nerveux central. Ce sérotype transduit principalement les cellules épendymaires (Davidson *et al.*, 2000) et les astrocytes de la région sous ventriculaire (SVZ) (Liu *et al.*, 2005b).

Les sérotypes plus récents, l'AAVr 6, 7, 8, 9 et 10 ont également été évalués dans le système nerveux central (Huszthy *et al.*, 2005; Cearley and Wolfe, 2006; Harding *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2006). L'AAVr 8 permet un transfert de gène plus efficace que l'AAVr 2 et l'AAV1, notamment dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le bulbe olfactif et le cervelet de souris nouveau-nés (Broekman *et al.*, 2006). Ce sérotype présente un tropisme étendu dans le SNC dû probablement à la fixation avec un récepteur ubiquitaire. L'efficacité de transduction accrue de ce sérotype peut être due à une libération plus rapide de l'ADN dans le noyau, permettant la formation plus rapide de double brin d'ADN. L'AAVr 8 transduit principalement les neurones (Cearley 2005), bien qu'une étude récente est montrée une transduction des oligodendrocytes après injection dans le striatum de rat (Muramatsu – Abstract- Parvovirus 2006). Les profils de transduction des sérotypes d'AAVr 7, 8, 9 et 10 ont été comparés dans le SNC de souris (Cearley and Wolfe, 2006). Tous ces sérotypes transduisent efficacement les neurones dans le striatum, le cortex, l'hippocampe et le thalamus. En revanche aucun de ces sérotypes n'a transduit les astrocytes ou les oligodendrocytes. L'AAVr 9 et l'AAVr 10 montrent une distribution beaucoup plus large du vecteur dans toutes les zones injectées. L'AAVr 9 transduit plus efficacement le cortex et l'hippocampe, et l'AAVr 10 le striatum et le thalamus. Il est possible de hiérarchiser l'efficacité de transduction de ces sérotypes dans le cerveau de souris (Harding *et al.*, 2006). L'AAVr 9 et 10 permettent le transfert de gène le plus efficace, suivi par l'AAVr 7, puis l'AAVr 8, l'AAVr 5, l'AAVr 6 et l'AAVr 2 qui sont similaires.

3 Méthodes permettant d'augmenter la distribution du vecteur dans le SNC

Certaines affections diffuses du système nerveux central comme les maladies de surcharge lysosomales nécessitent une correction de la totalité du cerveau (cf. § les maladies de surcharge lysosomales). L'injection intracérébrale d'un AAVr conduit à une transduction principalement localisée au niveau du site d'injection. Une des solutions pour permettre une distribution plus large du vecteur est de multiplier les sites d'injection. L'inconvénient de cette approche est qu'elle multiplie également les risques liés à l'acte chirurgical en lui-même.

D'autres stratégies pour tenter d'optimiser la distribution et l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr ont donc été développées.

Une de ces stratégies est appelée *convection enhanced delivery* (CED). Elle consiste à maintenir un gradient de pression au cours du temps permettant une administration et une distribution des molécules à de larges régions cérébrales. Cette technique a permis l'administration efficace de protéines, telles que des facteurs neurotrophiques, ou de vecteurs viraux dans le cerveau de rats et de primates (Bankiewicz *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001). L'utilisation de cette technique pour l'administration de vecteurs viraux améliore la distribution du vecteur dans le cerveau et permet une expression plus uniforme du transgène (Bobo *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1994; Lieberman *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 2000). L'administration d'un vecteur AAVr 2 par CED et par injections multiples a été comparée dans le striatum de primates (Hadaczek *et al.*, 2006). Une seule administration du vecteur par CED permettait de transduire 75% du putamen. Ils ont également trouvé des cellules transduites à distance du site d'injection, dans le globus pallidus, le noyau subthalamique, la substance noire et le thalamus. La distribution du vecteur obtenue par CED est équivalente à celle observée après de multiples injections dans le striatum. L'utilisation de cette technique apparaît donc plus avantageuse, puisqu'une seule injection suffit.

Une autre stratégie consiste à combiner l'injection d'AAVr avec du mannitol qui va induire une hyperosmolarité. Cet adjuvant est utilisé pour ouvrir transitoirement la barrière hémato-encéphalique (Muldoon *et al.*, 1995). L'administration du mannitol peut se faire localement ou en systémique. Une injection locale de mannitol facilite le transfert de gène dans les neurones, et permet une augmentation du nombre total de cellules transduites et de la distribution du vecteur de 200 à 300% (Mastakov *et al.*, 2001). Le mécanisme permettant une telle augmentation n'est pas clairement identifié. Il est possible que l'effet osmotique en diminuant la taille des cellules augmente l'espace interstitiel et ainsi facilite la diffusion du vecteur et sa fixation aux cellules. L'effet d'une administration locale et systémique de mannitol sur la distribution d'un vecteur AAVr 2 a été évalué dans le SNC de rat (Burger *et al.*, 2004). L'administration intrapéritonéale de mannitol, 15 min avant l'injection intra striatale d'un AAVr 2-GFP permet d'améliorer le transfert de gène dans les neurones du striatum, augmentant le nombre de cellules transduites de 400% et la distribution du vecteur de 200%. A la différence, la co-administration locale de mannitol dans le striatum n'augmente que de 25% le nombre de cellules transduites et n'a qu'un faible effet sur la distribution du

vecteur. Il semblerait donc, à la vue de ces résultats, que la co-administration du mannitol par voie systémique permette une diffusion plus large du transgène.

Egalement la co-injection d'héparine avec un vecteur AAVr 2 permet d'augmenter la diffusion du vecteur dans le système nerveux central (Mastakov *et al.*, 2002b). Cependant cette approche ne présente un intérêt que dans le cas du sérotype 2. En effet l'héparine est un analogue de l'héparane-sulfate et peut donc se lier aux récepteurs cellulaires protéoglycanes héparane sulfate (HSPG). La transduction par l'AAVr 2 est dépendante de ces récepteurs, et est inhibée par l'héparine soluble (Summerford and Samulski, 1998). La co-injection d'héparine en masquant un certain nombre de récepteurs à la surface des neurones permet d'augmenter la diffusion du vecteur. La co-injection d'AAVr 2 et d'héparine permet d'augmenter la distribution du vecteur de 400% dans le cerveau de rat (Mastakov *et al.*, 2002a). Cependant des doses trop fortes d'héparine peuvent provoquer des hémorragies et des lésions tissulaires. Les auteurs ont déterminé une fenêtre thérapeutique d'utilisation de l'héparine : entre 3,3 et 33,3 µg d'héparine totale par injection. L'héparine peut être remplacé par des pentasaccharides, dont l'utilisation est plus adaptée pour des études pré-cliniques ou cliniques car le risque hémorragique est moindre (Turpie *et al.*, 2001). Une approche similaire a été effectuée avec le facteur de croissance basique des fibroblastes qui se fixe sur un des co-récepteurs de l'AAVr 2 (le récepteur au facteur de croissance des fibroblastes) (Hadaczek *et al.*, 2004).

4 Transport axonal des AAVr

Les transports axonaux permettent le transfert bidirectionnel des molécules du corps cellulaire aux terminaisons axonales. Quatre types de transports axonaux sont décrits : les transports rapides (antérograde et rétrograde), le transport antérograde lent et le transport des mitochondries. Le transport antérograde permet le transport des molécules du corps cellulaire vers les terminaisons axonales. Il est médié par un moteur moléculaire : la kinésine. A l'inverse, le transport rétrograde permet le transport des molécules des terminaisons axonales vers le corps cellulaire et utilise la dynéine comme moteur moléculaire. Certains virus sont capables d'utiliser les transports rapides pour se déplacer le long des axones, et en particulier le virus de l'Herpes simplex 1 (HSV-1) et le virus rabique. Le virus HSV-1 entre dans les terminaisons nerveuses et utilise le transport rétrograde pour atteindre le corps cellulaire

(Bearer *et al.*, 2000). De la même manière, le virus rabique migre de son point d'inoculation au SNC par transport rétrograde, grâce à l'interaction d'une phosphoprotéine du virus avec la sous-unité LC8 de la dynéine (Jacob *et al.*, 2000). L'AAV n'est pas spécialement décrit comme un virus utilisant les transports axonaux pour se déplacer lors d'une infection naturelle. Malgré cela, plusieurs études ont décrit un transport axonal du vecteur ou de la protéine après injection intramusculaire, intraoculaire ou intracérébrale d'un AAVr. L'avantage du transport axonal est de pouvoir transduire des régions qui ne peuvent pas être injectées directement. Un transport rétrograde de l'AAVr 2 du muscle vers les motoneurones de la moelle épinière a été mis en évidence chez la souris (Kaspar *et al.*, 2003). L'injection d'AAVr-IGF1 dans les muscles respiratoires dans un modèle de souris ALS a permis de cibler les motoneurones affectés. L'expression du facteur neurotrophique IGF-1 dans les motoneurones a permis de prolonger la vie de ces souris et de retarder la progression de la maladie. Par la suite Ils ont mis en évidence un transport rétrograde pour les sérotypes d'AAVr 1 à 6, avec un transport privilégié pour les sérotypes 1,2 et 6 (Kaspar *et al.*, 2004). Après injection d'un vecteur AAVr 2 dans le quadriceps, 2,5% du virus total injecté est transporté de façon rétrograde vers la moelle épinière. D'autres études ont montré un transport antérograde du transgène de la rétine vers le cerveau après injection intraoculaire. Après injection intravitréenne d'un vecteur AAVr 2, une expression du transgène est observée dans les voies visuelles (Dudus *et al.*, 1999), dans le cortex visuel, le tectum et le thalamus ; suggérant ainsi un transport transsynaptique de la protéine (Hennig *et al.*, 2003). Aucune séquence AAV n'a été détectée dans les régions cérébrales, invalidant l'hypothèse d'un passage transsynaptique du vecteur. Cependant une étude récente a pu mettre en évidence un transport antérograde de l'AAV2 avec passage transsynaptique après injection intravitréenne chez le rat et chez le chien (Provost *et al.*, 2005). Ils ont détectés les séquences AAV tout le long des voies visuelles, incluant le nerf optique, le chiasma optique, le tractus optique, le corps géniculé latéral, le colliculus, les radiations optiques et le cortex visuel.

Le transport axonal de l'AAVr a également été étudié après injection intracérébrale. Selon le site d'injection, ces études ont pu montré un transport antérograde ou rétrograde de l'AAVr. Un transport antérograde d'un vecteur AAVr 2-GFP a été mis en évidence dans le cerveau antérieur, le tronc cérébral et la moelle épinière après injection dans le noyau parabrachial de rats (Chamberlin *et al.*, 1998). L'injection d'un vecteur AAVr 2 dans le striatum de rats permet un transport antérograde vers le globus pallidus (Hadaczek *et al.*, 2004). Selon les régions ciblées un transport rétrograde a pu être observé. Ainsi une

administration d'un vecteur AAVr 2 au niveau des terminaisons axonales de l'hippocampe et du striatum permet un transport rétrograde et une expression du transgène dans les zones de projection spécifique dans le cortex entorhinal et de la substance noire (Kaspar *et al.*, 2002). L'existence d'un transport rétrograde d'un vecteur AAVr 2 suite à une injection intracérébrale n'a été, cependant, que rarement observé dans d'autres études. Il semblerait que les sérotypes présentent des affinités différentes pour le transport axonal. Un transport rétrograde a pu être mis en évidence pour les sérotypes 1 et 5 chez le rat (Burger *et al.*, 2004). Des cellules GFP positives sont retrouvées dans le septum médial après injection de ces deux sérotypes dans l'hippocampe, dans le cortex moteur après injection dans la moelle épinière et dans la substance noire après injection dans le striatum. Le transport rétrograde d'un AAVr 5-GFP vers la substance noire après injection intrastriatiale chez le rat a été confirmé dans une autre étude (Paterna *et al.*, 2004). L'AAVr semblerait donc se déplacer selon les voies nigrostriatales. Le transport axonal a été démontré en administrant de la colchicine à certains rats avant l'injection du vecteur AAVr 5. La colchicine bloque le transport axonal rapide en désorganisant les microtubules (Edstrom *et al.*, 1979). Les animaux traités avec la colchicine ne présentent aucune cellule GFP positive dans la substance noire.

Cependant la critique qui pourrait être faite à toutes ces études, hormis celle d'Hadaczek, est qu'elles n'ont pas réellement démontré un transport axonal de l'AAVr. En effet elles ont montré une expression du transgène à distance, mais cela n'implique pas forcément une transduction des cellules dans ces zones. Il peut s'agir d'un transport axonal exclusivement de la protéine. Il aurait pu être intéressant de rechercher la présence de séquences AAVr dans ces structures.

La possibilité d'un transport axonal des vecteurs AAVr rend celui-ci particulièrement intéressant pour un certain nombre d'applications. Cette propriété de l'AAVr pourra notamment être utilisée pour cibler des zones non abordables par injection directe, comme la moelle épinière par exemple. Pour le moment le mécanisme par lequel l'AAVr est transporté n'est pas connu. Est-ce par internalisation dans des vésicules du fait de sa petite taille ? ou par interaction de la capside avec les moteurs moléculaires ?

5 Immunogénicité des AAVr après injection intracérébrale

Le cerveau a longtemps été considéré comme un site immunologiquement privilégié grâce à l'existence de la barrière hémato-encéphalique. Cependant ce dogme a été ébranlé ces dernières années par différentes études montrant l'apparition d'une réponse immunitaire et/ou inflammatoire à la suite d'une injection intracérébrale de vecteurs AAVr. Normalement, la barrière hémato-encéphalique empêche la réponse immunitaire périphérique d'atteindre le SNC. Cependant, lors d'une injection intracérébrale, cette barrière se trouve momentanément et localement interrompue.

L'expression à long terme d'un transgène n'est accompagnée d'aucune réaction inflammatoire chez des animaux naïfs si le taux de transduction est faible et l'activité du promoteur faible (Mandel *et al.*, 1997; Mandel *et al.*, 1998). Une réponse humorale est observée si les animaux ont été pré-exposés à l'AAVr 2 (Peden *et al.*, 2004; Sanftner *et al.*, 2004). Cette réponse immune varie en fonction du délai séparant les deux administrations du vecteur AAVr 2. La transduction n'est pas inhibée si la seconde administration a lieu 2 à 4 mois après la première injection (Lo *et al.*, 1999). En revanche si l'intervalle entre les 2 injections est plus court, de l'ordre de 2 à 4 semaines, l'expression du transgène est significativement réduite (Mastakov *et al.*, 2002b). D'autres études ont voulu évaluer les conséquences d'une pré-immunité contre l'AAV2 sauvage sur l'injection intracérébrale d'un vecteur AAVr 2. Dans ce but, des rats ont été immunisés contre l'AAV2 sauvage par de multiples injections périphériques (Peden *et al.*, 2004). Ces rats présentent des titres élevés d'anticorps neutralisants circulants. L'injection intrastriale d'un vecteur AAVr 2 n'a conduit à aucune expression du transgène ; les anticorps neutralisants ayant bloqué la transduction des neurones du striatum. En revanche la transduction par un vecteur AAVr 5 n'est pas gênée par cette pré-immunité. Dans une autre étude, des rats ont été immunisés en périphérie par injection sous-cutanée d'un vecteur AAVr 2 vide (c'est-à-dire ne présentant pas de cassette d'expression transcriptionnellement active) (Sanftner *et al.*, 2004). Ils ont effectué 3 semaines après une injection intrastriale. La pré- immunisation a entraîné une diminution de 49% du nombre de cellules transduites et a diminué de 58% le volume de transduction. La présence d'anticorps neutralisant a influencé significativement l'efficacité de transduction dans cette étude, sans l'abolir cependant (Burger *et al.*, 2005; McCown, 2005).

6 Applications du transfert de gène médié par l'AAV dans les désordres neurologiques

Les vecteurs AAVr sont les candidats idéaux pour le transfert de gène dans les maladies neurologiques. Ils sont capables de transduire les neurones (Bartlett *et al.*, 1998), les astrocytes (Davidson *et al.*, 2000) et les oligodendrocytes (Chen *et al.*, 1998) qui sont les principales cellules cibles dans les désordres neurologiques. De plus, ils permettent un transfert de gène stable et à long terme, plus de 19 mois dans le cerveau de rat (Peel and Klein, 2000) et 6 ans dans le cerveau de primates (Bankiewicz *et al.*, 2006). L'AAVr peut véhiculer une protéine thérapeutique, un facteur neurotrophique ou encore un ARN interférence. Nous allons plus précisément nous intéresser à trois maladies neurodégénératives, pour lesquelles les stratégies thérapeutiques envisagées regroupent toutes les potentialités du transfert de gène dans le SNC médié par l'AAVr.

6.1 La maladie de Parkinson

C'est une maladie neurodégénérative courante, affectant principalement la population âgée (1 à 2% de la population âgée de plus de 50 ans). Elle est caractérisée par la perte progressive d'un neurotransmetteur, la dopamine, dans le striatum. Elle est associée à une perte des cellules productrices de dopamine dans la substance noire. Les patients présentent des troubles moteurs : tremblements, rigidité, bradykinésie. Les causes moléculaires de la maladie ne sont pas clairement élucidées. La découverte de certaines mutations dans des gènes spécifiques, tels que le gène parkin, α -synuclein, etc. (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Kruger *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998) a permis de mieux appréhender les voies cellulaires impliquées. La synthèse de la dopamine est un processus en deux étapes. Lors de la première étape l'acide aminé tyrosine est converti en L-Dopa par la tyrosine hydroxylase (TH), puis la L-Dopa est convertie en dopamine par la décarboxylase L-Dopa ou décarboxylase acide aminé aromatique 1 (AADC, *aromatic amino acid decarboxylase 1*). Le cofacteur BH4 est nécessaire au fonctionnement de l'enzyme TH. Il est produit par l'enzyme GTP cyclohydrolase I (GTPCH1).

Un des traitements consiste à apporter par voie orale le précurseur de la dopamine, la L-Dopa. Il n'est pas possible d'apporter directement la dopamine car celle-ci ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Ce traitement est efficace pendant les premières années de la maladie et permet une amélioration des dysfonctionnements moteurs. Cependant l'efficacité de cette drogue diminue au cours du temps, à cause de la disparition de l'enzyme AADC due à l'atrophie de la substance noire. Il faut donc augmenter la fréquence et la quantité de L-Dopa ingérée pour obtenir un effet clinique. L'augmentation des doses engendre des effets secondaires : hallucinations, troubles hormonaux, dyskinésie.

L'utilisation des vecteurs AAVr pour le traitement de la maladie de Parkinson s'est principalement axée sur la prévention de la perte des neurones dopaminergiques dans la substance noire et sur l'apport des enzymes synthétisant la dopamine directement dans le striatum. Le GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) est un facteur de croissance efficace pour les neurones dopaminergiques des régions affectées dans la maladie de Parkinson (Kirik *et al.*, 2004). Chez des modèles rongeurs et primates de Parkinson, l'administration de vecteurs AAVr-GDNF dans la substance noire et le striatum a permis d'empêcher la perte des neurones dopaminergiques et également de restaurer partiellement les fonctions motrices (Mandel *et al.*, 1997; Mandel *et al.*, 1999; Ozawa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Eslamboli *et al.*, 2005). Cependant la surexpression de GDNF peut conduire à des effets secondaires (Kordower *et al.*, 1999; Nutt *et al.*, 2003) ; suggérant la nécessité de réguler son expression. Un autre facteur neurotrophique, la neuturine, est étudié (Horger *et al.*, 1998; Rosenblad *et al.*, 1999). Ce facteur est aussi efficace que le GDNF et sa surexpression n'entraîne pas d'effets secondaires. Une autre stratégie thérapeutique consiste à utiliser le transfert de gène médié par l'AAVr pour produire la dopamine directement sur son site d'action. Ainsi, la co-injection dans le striatum d'un vecteur AAVr-TH et d'un vecteur AAVr-GTPCH1 permet la production de forts niveaux de L-Dopa striatal et une diminution des symptômes Parkinsonien (Mandel *et al.*, 1998; Leff *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000; Sanchez-Pernaute *et al.*, 2001; Kirik *et al.*, 2002; Muramatsu *et al.*, 2002; Carlsson *et al.*, 2005). Comme cela a été décrit précédemment l'atrophie de la substance noire entraîne une perte de l'enzyme AADC et donc l'absence de conversion de la L-Dopa en dopamine. La triple transduction de cellules striatales par des vecteurs AAVr portant les enzymes TH, GTPCH1 et AADC dans un modèle primate de Parkinson permet une amélioration des troubles moteurs (Muramatsu *et al.*, 2002). L'injection intrastriatale d'un vecteur AADC a également été testée en association avec l'administration par voie orale de L-Dopa (Leff *et al.*, 1999; Forsayeth *et al.*, 2006).

L'association d'une injection intrastriatale d'un vecteur AAVr 2-AADC avec l'administration de L-Dopa permet une amélioration clinique à long terme (plus de 6 ans) dans un modèle primate parkinsonien (Bankiewicz *et al.*, 2006). Cette stratégie thérapeutique permet de rester dans des doses tolérables de L-Dopa et ainsi d'éliminer les effets secondaires observés avec les surdoses. Ces résultats ont conduit à la mise en place d'un essai de phase I sur des patients parkinsoniens avancés. Cet essai est sponsorisé par Avigen (Mandel and Burger, 2004). Finalement, une dernière stratégie thérapeutique consiste à surexprimer une protéine anti-apoptotique dans la substance noire en utilisant un vecteur AAVr. Cette stratégie a permis d'empêcher la dégénérescence nigrostriatale dans un modèle murin parkinsonien MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Mochizuki *et al.*, 2001; Mochizuki *et al.*, 2002) (pour revue Mandel *et al.*, 2006; Warrington and Herzog, 2006).

6.2 La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients. Elle survient en moyenne autour de 65 ans et concerne actuellement environ 350 000 personnes en France (Selkoe, 1999). Les symptômes incluent pertes de mémoire, altération du jugement, confusion, changement de personnalité, désorientation et perte du langage. La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par des lésions histopathologiques caractéristiques qui sont l'accumulation de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Une troisième lésion caractéristique est l'atrophie corticale. Plusieurs mutations génétiques ont été associées à la maladie d'Alzheimer grâce à l'étude de cas familiaux de cette maladie. Les mutations sur le gène de la préséniline-1 (PS-1) sont les plus fréquentes aboutissant en règle générale à un début précoce de la maladie. L'évolution est rapide et peut comporter des myoclonies et des crises d'épilepsie. Les mutations du gène de la préséniline-2 (PS-2) sont plus rares. La maladie se déclare vers 55 ans mais ne montre aucune différence clinique avec la forme sporadique. Les mutations des gènes des présénilines auraient pour conséquence une altération de l'homéostasie calcique dans le réticulum endoplasmique, une augmentation du stress oxydatif mitochondrial et de l'apoptose. Le gène de l'APP (protéine précurseur de l'amyloïde) présente de rares mutations (moins de 30 familles connues aujourd'hui dans le monde). La maladie débute vers 50 ans et présente une évolution classique. Les formes

héréditaires de la MA représentent 10-15 % de l'ensemble. Il existe également des formes sporadiques.

Il semblerait que les fonctions cholinergiques soient impliquées dans la mémoire. Il a été démontré que le NGF (*Nerve growth factor*) est un facteur trophique pour les neurones cholinergiques du cerveau antérieur basal (Hefti, 1986; Williams *et al.*, 1986). L'apport de NGF via un vecteur AAVr dans le septum médial protège les neurones cholinergiques dans un modèle de mort cellulaire (Mandel *et al.*, 1999). L'injection d'un AAVr-NGF dans le cerveau antérieur basal de rats d'âge moyen permet une protection contre la perte des neurones cholinergiques et la perte de mémoire liées à l'âge (Klein *et al.*, 2000). La limite de cette stratégie est qu'elle ne cible qu'un type neuronal spécifique. Néanmoins des résultats positifs ont été obtenus après transplantation de fibroblastes autologues exprimant le NGF chez des patients Alzheimer. Ces résultats ont conduit à la mise en place d'un essai clinique de phase I consistant en l'administration d'un AAVr-NGF chez des patients Alzheimer (Mandel and Burger, 2004).

Une autre stratégie thérapeutique consiste à réduire les plaques amyloïdes. Un vecteur AAVr portant l'ADNc β -amyloïde est injecté par voie intramusculaire ou administré par voie orale afin d'induire la formation d'auto-anticorps contre la protéine β -amyloïde. Cette stratégie a permis de réduire les plaques amyloïdes sans entraîner une réaction immune dans un modèle murin d'Alzheimer (Zhang *et al.*, 2003; Hara *et al.*, 2004) (pour revue Mandel *et al.*, 2006; Warrington and Herzog, 2006).

6.3 La maladie de Huntington

C'est une maladie autosomique dominante mortelle. Elle est causée par l'expansion de codons glutamine dans le premier exon du gène codant pour la huntingtine. Une répétition de plus de 38 glutamines dans cette protéine provoque la maladie de Huntington, alors qu'une répétition de 35 glutamines n'entraîne aucune maladie (Gusella and MacDonald, 1995). Plus le nombre de répétitions est élevé, plus l'apparition de la maladie est précoce (Brandt *et al.*, 1996). Cette maladie est caractérisée par de sévères troubles cognitifs, psychiatriques et moteurs. Le rôle de la protéine endogène ainsi que les mécanismes pathologiques de la forme mutante ne sont pas connus. Toutefois, il a été montré que la protéine mutante s'agrège dans

les cellules (Perutz, 1995) et entraîne la mort des neurones GABAergiques dans les neurones du striatum (Vonsattel *et al.*, 1985; Scherzinger *et al.*, 1999; Ravikumar *et al.*, 2002). Des souris transgéniques ou des modèles induits par l'excitotoxine sont utilisés pour étudier le transfert de gène médié par l'AAVr dans la maladie de Huntington. Deux stratégies thérapeutiques sont évaluées. La première consiste en l'apport de facteurs neurotrophiques, la seconde vise à éliminer le mutant huntingtine. L'injection intrastriatale de vecteurs AAVr exprimant le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ou le GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) a empêché la mort des neurones du striatum dans deux modèles de Huntington induits par des drogues. Cependant les potentiels effets secondaires de ces facteurs neurotrophiques limitent leur utilisation, tant que leur utilisation ne pourra pas être régulé efficacement (cf. § Régulation de l'expression du transgène *in vivo*). De plus il est nécessaire de tester l'efficacité de ces deux facteurs neurotrophiques dans un modèle de souris transgénique plus proche de la maladie humaine.

La majorité des patients Huntington sont hétérozygotes pour l'allèle huntingtine mutant. Une approche thérapeutique consistant à bloquer les effets toxiques de l'allèle muté tout en préservant les effets bénéfiques de l'allèle normal a été envisagée (Davidson and Paulson, 2004). Ainsi l'injection intrastriatale de vecteurs AAVr 1 ou AAVr 5 véhiculant des shRNA (*short hairpin RNA*) ciblant des régions spécifiques de l'ARNm muté de la huntingtine dans des souris transgéniques améliore les troubles moteurs et neurologiques (Harper *et al.*, 2005; Rodriguez-Lebron *et al.*, 2005). Dans ces deux études le nombre d'ARNm mutants est diminué de 50%, permettant ainsi l'amélioration du phénotype cellulaire et comportementale.

Nous allons maintenant nous intéresser plus précisément à une famille de maladies affectant le système nerveux central, les maladies de surcharge lysosomale.

V LES MALADIES DE SURCHARGES LYSOSOMALES

1 Généralités

Les maladies lysosomales sont dues à un déficit des enzymes intervenant dans le catabolisme des molécules complexes : glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides, etc... Il existe plus de 40 maladies de surcharge lysosomale. Considérées individuellement ces maladies sont rares, mais ensemble elles ont une fréquence de 1 pour 7000 naissances, équivalente à celle de la mucoviscidose. Ces maladies sont associées à une morbidité et à une mortalité élevées et sont souvent dévastatrices pour les patients et leur famille. Elles représentent un problème de santé majeur, avec un coût très élevé pour la société en raison des nécessités d'hospitalisation, d'interventions chirurgicales et des prises en charge paramédicales visant à améliorer la qualité et l'espérance de vie des malades (Meikle *et al.*, 1999)

Les maladies de surcharge lysosomales sont transmises selon un mode autosomique récessif, à l'exception de la mucopolysaccharidose (MPS) II (déficit en Iduronate-2-sulfatase) et de la maladie de Fabry (déficit en α -Galactosidase) liées à l'X. La plupart de ces maladies sont dues à une diminution significative (< 10% du niveau physiologique) ou à une absence complète d'une enzyme lysosomale. Plus rarement, elles sont causées par le déficit de protéines non enzymatiques (saponine ou activateurs des gangliosides GM2) dont le rôle est d'activer certaines enzymes lysosomales. Ces maladies lysosomales sont connues sous le nom des sphingolipidoses (Tay-Sach, Gaucher etc) (Neufeld and Muenzer, 1995). Dans d'autres cas, il peut s'agir d'un déficit ou d'un dysfonctionnement d'un des transporteurs localisé dans la membrane lysosomale (Niemann-Pick C, la céroïde lipofuscinose juvénile neuronale). Enfin, elles peuvent être dues à des mutations dans des protéines nécessaires au trafic intracellulaire des enzymes lysosomales (figure 12). Toutes ces maladies sont des maladies multisystémiques, caractérisées par une atteinte du squelette, du système nerveux central, du système cardiovasculaire, et du système oculaire.

Les maladies de surcharge lysosomales peuvent être classées, selon la voie de dégradation impliquée et la nature du substrat accumulé, en 4 groupes : les mucopolysaccharidoses, les lipidoses, les glycoprotéinoses et les glycogénoses de type II

(Tableau IV). La majorité des maladies appartenant à ces 4 groupes montrent une variabilité clinique, en particulier concernant l'âge d'apparition de la maladie et la progression des symptômes. Elles peuvent exister sous trois formes : infantile (sévère), juvénile (intermédiaire), et adulte (légère). La forme infantile, la plus sévère, présente des atteintes neurologiques aiguës. Les patients décèdent dans leurs premières années de vie. Dans la forme adulte, les symptômes se développent plus lentement, et il s'agit principalement d'atteintes périphériques (pour revue Caillaud and Poenaru, 2000).

Les maladies de surcharge lysosomale sont des maladies monogéniques. De nombreuses mutations ont été identifiées dans les gènes codant pour les enzymes lysosomales. Il s'agit de mutations faux-sens, non-sens, de mutations du site d'épissage, de délétions partielles et d'insertions. Certaines de ces mutations conduisent à une perte complète d'activité enzymatique alors que d'autres provoquent une activité réduite. La corrélation génotype-phénotype est parfois difficile à établir. Les symptômes cliniques sont hétérogènes y compris en l'absence de l'enzyme fonctionnelle. Le plus souvent un phénotype sévère est observé en l'absence totale d'activité enzymatique, alors que les mutations permettant une activité enzymatique résiduelle sont responsables de symptômes moins graves. La variabilité phénotypique pourrait s'expliquer par le contexte génétique du patient et par des facteurs environnementaux et épigénétiques (Beck, 2001; Maire, 2001).

Le dépistage prénatal de ces maladies n'est effectué qu'en cas d'antécédent familial. Dans ce cas un diagnostic prénatal peut être disponible. Malheureusement dans la majorité des cas, les enfants affectés sont diagnostiqués plusieurs mois après la naissance lors de l'apparition des premiers symptômes communs à plusieurs maladies lysosomales. Le diagnostic est généralement établi à la suite d'examens radiologiques, et pour certains patients la preuve de la surcharge est observée sur un frottis sanguin ou sur une ponction médullaire. Par la suite des tests enzymatiques permettent d'établir un diagnostic précis de la maladie de surcharges lysosomales.

Nous allons plus précisément nous intéresser aux mucopolysaccharidoses et en particulier à la mucopolysaccharidose de type I qui a fait l'objet de notre étude.

2 La mucopolysaccharidose de type I (MPS I):

2.1 A propos des MPS :

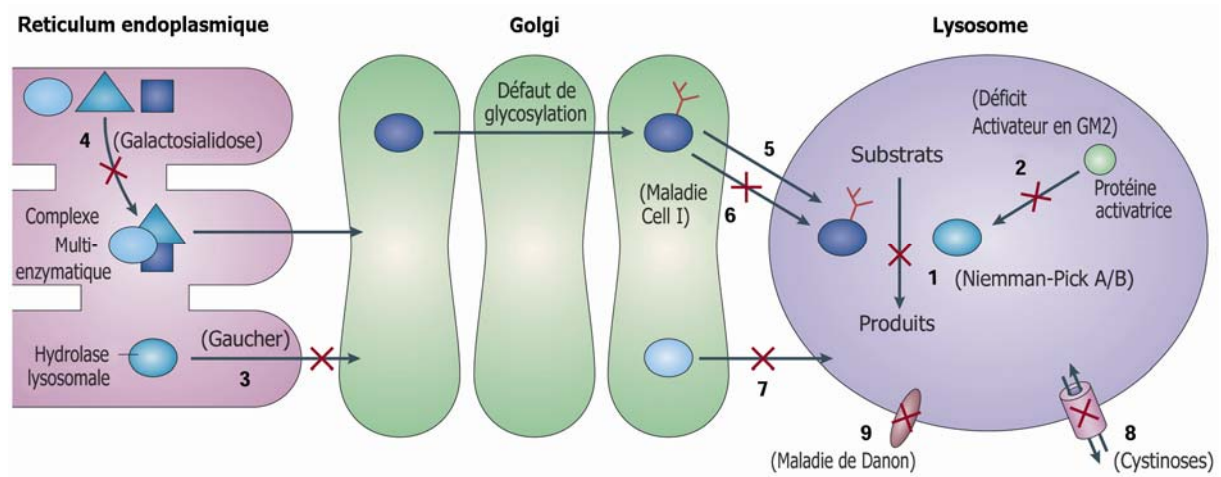
Les MPS sont un groupe de maladies héréditaires causées par le déficit d'une enzyme lysosomale intervenant dans le catabolisme des glycosaminoglycanes (GAG ou mucopolysaccharides). Les GAG sont des polysaccharides composés d'environ 20 à 200 unités disaccharidiques répétées et organisées en longues chaînes. Le motif disaccharide est toujours constitué d'un dérivé de sucre aminé, glucosamine ou galactosamine. Au moins un des sucres du motif est carboxylé ou sulfaté (Jolly and Walkley, 1997). Les principaux GAG accumulés sont: les dermatane-sulfates (DS), les héparane-sulfates (HS), les kératane-sulfates (KS) et les chondroïtine-sulfates (CS).

Ces GAG sont dégradés dans les lysosomes par une cascade enzymatique comprenant 10 enzymes. Chaque étape nécessite l'hydrolyse du substrat par l'enzyme précédente. Ainsi, l'absence d'une seule de ces enzymes provoque le blocage de cette cascade et conduit à l'accumulation des macromolécules non dégradées dans les lysosomes, affectant l'architecture et la fonction des cellules, puis des tissus et ainsi des organes. Plusieurs types de GAG peuvent être accumulés en fonction de l'étape de dégradation impliquée. Ces GAG sont accumulés dans les lysosomes de divers tissus et sont excrétés dans les urines.

Sept formes de MPS ont été décrites (MPS I à MPS VII) selon l'enzyme lysosomale déficiente. Elles sont toutes transmises selon un mode autosomique récessif à l'exception de la MPS II (Hunter) (Tableau V). Une même MPS peut exister sous trois formes : sévère, intermédiaire et légère.

Le tableau clinique associe atteinte multisystémique, organomégalie, dysostose multiple, et dysmorphie faciale. La vision, l'ouïe, la fonction cardiovasculaire et la mobilité articulaire peuvent également être affectées. Un retard mental sévère est observé dans les formes sévères de MPS I (syndrome de Hurler), de MPS II (syndrome de Hunter), dans tous les sous types de MPS III, et dans la MPS VII, mais est absent dans les autres MPS.

Figure 12 : Les bases biochimiques et cellulaires des maladies de surcharge lysosomale



Adapté de Futerman *et al.*, 2003.

La plupart des mutations dans les maladies de surcharge lysosomale aboutissent au déficit d'une enzyme lysosomale conduisant à une accumulation des substrats non dégradés dans le lysosome (1). Dans d'autres cas, c'est une protéine permettant une activité optimale de l'hydrolase qui est défectueuse ou absente (2). Une maladie de surcharge lysosomale peut également être due à une mutation conduisant à une erreur d'adressage à la sortie du reticulum endoplasmique (RE) (3). Le transport défectueux de l'enzyme lysosomale en dehors du RE peut également être causée par l'absence d'un complexe multi-enzymatique nécessaire à ce transport (4). Dans l'appareil de Golgi, un défaut de glycosylation peut aboutir à une enzyme avec une activité catalytique réduite (5). Un défaut de glycosylation peut également entraîner la production d'enzyme ne pouvant lier les Rc au Mannose-6-P empêchant ainsi leur entrée dans les lysosomes (6). D'autres étapes de transport à partir de Golgi peuvent être impliqués (7). Il peut également s'agir d'un déficit ou d'un dysfonctionnement d'un des transporteurs localisé dans la membrane lysosomale (8) ou de protéines régulatrices (9).

Les hydrolases lysosomales sont représentées par différentes teintes de bleu. Un exemple de maladies de surcharge lysosomale est donné entre parenthèses.

Tableau IV : Classification des maladies de surcharge lysosomale

Maladie	Déficit enzymatique	Substrat(s) accumulé(s)
<u>Sphingolipidoses</u>		
Landing : gangliosidoses à GM1	β -Galactosidase	Ganglioside GM1/ galactosyloligosaccharides /KS
Tay-Sachs : gangliosidoses à GM2 variant B ou B1	Hexoaminidase A	Ganglioside GM2/ asialo-GM2
Sandhoff : gangliosidoses à GM2 variant O	Hexoaminidase A ou B	Ganglioside GM2/ asialo-GM2 globoside
Gangliosidoses à GM2 variant AB	Activateur en GM2	Ganglioside GM2/ asialo-GM2
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriasylcéramide
Farber lipogranulomatose	Céramidase	Céramide
Gaucher	β -Glucosidase Activateur saponine C	Glucosylcéramide
Niemann-Pick A et B	Sphingomyélinase	Sphingomyéline
Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A	Sulfatides
Krabbe	Galactosylcéramidase	Galactosylcéramide/ Galactosylsphingosine
Wolman	Lipase acide	Esters de cholestérol
Austin	Déficit multiple en sulfatase	Sulfatides
<u>Mucopolysaccharidoses</u>		
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie)	α -L-Iduronidase	Héparane Sulfate/ Dermatane Sulfate
MPS II (Hunter)	Iduronate-2-sulphatase	Héparane Sulfate/ Dermatane Sulfate
MPS IIIA (Sanfilippo)	Héparane sulphamidase	Héparane Sulfate
MPS IIIB (Sanfilippo)	N-Acétyle- α -glucosaminidase	Héparane Sulfate
MPS IIIC (Sanfilippo)	Acétyl CoA : α -glucosamide N-acétyltransférase	Héparane Sulfate
MPS IIID (Sanfilippo)	N-Acétyleglucosamine- 6-sulphatase	Héparane Sulfate
Morquio A	N-Acétyleglucosamine- 6-sulphate-sulphatase	Kératane sulfate/ Chondroïtine sulfate
Morquio B	β -Galactosidase	Kératane sulfate
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arylsulfatase B	Dermatane sulfate
MPVII (Sly)	β -Glucuronidase	Héparane sulfate/ Dermatane sulfate/ Chondroïtine sulfate

Maladie	Déficit enzymatique	Substrat(s) accumulé(s)
<u>Glycoprotéinoses :</u>		
Aspartylglucosaminurie	N-acétyl β -glucosaminidase	Aspartylglucosamine
Fucosidose	α -Fucosidase	Fucosyl-oligosaccharides/ Fucosyl-glycolipides
α -Mannosidose	α -Mannosidase	α -mannosyl-oligosaccharides
β -Mannosidose	β -Mannosidase	β -mannosyl-oligosaccharides
Schindler et Kanzaki	α -N-acétyl-galactosaminidase ou α -galactosidase B	Oligosaccharides/GAG/ glycosphingolipides
<u>Mucopolidoses :</u>		
Type I : Sialidose	α -Neuraminidase	Acide sialique
Type IB : Galactosialidose	Cathepsine A	
Type II et III : mucopolidoses	N-acétylglucosamine-1- phosphotransférase	
<u>Glycoqénoses de type II :</u>		
Pompe	α -Glucosidase ou maltase acide	Glycogène
<u>Céroides lipofuscinoses (CLN) :</u>		
CLN1 : forme infantile (Santavuori-Haltia)	Palmitoyl protein thioesterase	Saposines
CLN2 : infantile tardive	Tripeptidyl peptidase 1	Sub-unité C mitochondriale ATP
CLN3 : juvénile (Batten)	Protéine CLN3	
CLN4 : adulte (Kufs)	?	
CLN5 : infantile tardive variant Finlandais	Protéine CLN5	
CLN6 : infantile tardive variant	?	
CLN7 : infantile tardive variant	?	
CLN8 : épilepsie	Protéine transmembranaire	
<u>Autres :</u>		
Cystinoses	Cystinosine	Cystine
Salla	Porteur en acide sialique	Acide sialique
Acidurie méthylmalonique	Porteur vitamine B12	

Adapté de Caillaud *et al*, 2000 ; Futerman *et al*, 2004

Des tests enzymatiques simples sont disponibles pour le diagnostic des différentes MPS, en utilisant des fibroblastes, des leucocytes ou du sérum. Un diagnostic prénatal peut être fait à la suite d'une amniocentèse ou d'une biopsie des villosités chorioniques. En revanche, l'identification des individus hétérozygotes par test enzymatique est difficile. Bien que ces individus présentent théoriquement une activité enzymatique réduite de 50%, dans la réalité un chevauchement des activités catalytiques est observé entre des individus hétérozygotes et des individus homozygotes normaux. Les individus hétérozygotes peuvent être identifiés après analyse moléculaire de leur mutation (pour revue Neufeld and Muenzer, 1995).

2.2 Description de la MPS I :

La mucopolysaccharidose de type I est une maladie de surcharge lysosomale autosomique récessive dont l'incidence est de 1/80 000 naissances. Elle est causée par le déficit d'une enzyme lysosomale, l' α -L-Iduronidase, qui entraîne l'accumulation de dermatane-sulfate (DS) et d'héparane-sulfate (HS), dans les lysosomes des différents tissus. Leur accumulation est à l'origine d'une augmentation de la taille des lysosomes mais peut également altérer, secondairement, certaines voies biochimiques et cellulaires en aval, aboutissant à un dysfonctionnement cellulaire et tissulaire. La MPS I comprend 3 formes caractérisées par la sévérité des signes cliniques : la maladie de Hurler (MPS IH), la maladie de Hurler-Scheie (MPS IH/S) et la maladie de Scheie (MPS IS).

Tableau V : Classification des mucopolysaccharidoses

Nom	Eponyme	Manifestations cliniques	Déficit enzymatique	Glycosaminoglycanes affectés
MPS I H	Hurler	Opacité cornéenne, dysostose multiplexe organomégalie, atteintes cardiaques, retard mental, mort dans l'enfance	α -L-Iduronidase	Dermatane sulfate, héparane sulfate
MPS I S	Scheie	Opacité cornéenne, raideur articulaire, intelligence normale	α -L-Iduronidase	Dermatane sulfate, héparane sulfate
MPS H/S	Hurler/Scheie	Phénotype intermédiaire entre I H et I S	α -L-Iduronidase	Dermatane sulfate, héparane sulfate
MPS II	Hunter (sévère)	Dysostose multiplexe, organomégalie, retard mental, mort avant 15 ans	Iduronate sulfatase	Dermatane sulfate, héparane sulfate
MPS II	Hunter (modérée)	Intelligence normale, petite stature, survie entre 20 et 60 ans	Iduronate sulfatase	Héparane sulfate
MPS III A	Sanfilippo A	Retard mental sévère, hyperactivité	Héparane-N-sulfate	Héparane sulfate
MPS III B	Sanfilippo B	Phénotype similaire à III A	α -N-Acétylelucosaminidase	Héparane sulfate
MPS III C	Sanfilippo C	Phénotype similaire à III A	Acétyl-CoA	Héparane sulfate
MPS III D	Sanfilippo D	Phénotype similaire à III A	N-Acétylelucosamine-6sulfatase	Héparane sulfate
MPS IV A	Morquio A	Anomalies squelettiques, opacité cornéenne, hypoplasie odontoïde	Galactose-6-sulfatase	Kératane sulfate, chondroïtine sulfate
MPS IV B	Morquio B	Phénotype similaire à IV A	β -Galactosidase	Kératane sulfate
MPS VI	Maroteaux-Lamy	Dysostose multiplexe, opacité cornéenne, intelligence normale	Arylsulfatase B	Dermatane sulfate
MPS VII	Sly	Dysostose multiplexe, hépatosplénomégalie, retard mental	β -Glucuronidase	Dermatane sulfate, héparane sulfate, chondroïtine sulfate

Adapté de Neufeld et Muenzer (1995)

2.2.1 La maladie de Hurler :

Il s'agit de la forme la plus sévère de MPS I. C'est une maladie progressive avec des atteintes multiples des organes et tissus, et qui aboutit à un décès prématuré de l'enfant avant l'âge de 10 ans. Un enfant atteint du syndrome de Hurler apparaît normal à la naissance, mais peut présenter des hernies inguinales et ombilicales. Le diagnostic est établi entre 6 et 24 mois par l'association de différents signes cliniques tels que : une hépatosplénomégalie, des déformations squelettiques, une dysmorphie faciale, une langue élargie et un front proéminent. Les patients présentent également une atteinte cardiaque, une atteinte respiratoire et des opacités cornéennes. Ces enfants sont également atteints de nanisme sévère, leur taille ne dépassant généralement pas 110 cm. Au début de leur vie, les enfants peuvent s'asseoir, marcher et développer une maîtrise du langage précoce, cependant à partir de 2 ans une détérioration progressive a lieu. Les infections respiratoires et les complications cardiaques sont responsables du décès (Neufeld and Muenzer, 1995). Le retard mental observé chez ces patients pourraient être en partie dû à une accumulation de sphingolipides, GM2 et GM3, dans la substance blanche et la substance grise (Constantopoulos and Dekaban, 1978).

2.2.2 La maladie de Hurler/Scheie

La maladie de Hurler/Scheie est la forme intermédiaire ou modérée des (Hopwood and Morris, 1990). Elle est caractérisée par des atteintes somatiques, incluant des dysostoses multiples, avec une légère ou aucune dysfonction intellectuelle. Les patients présentent, comme ceux atteints de la forme sévère, une hépatosplénomégalie et une opacité de la cornée. Une hydrocéphalie due à une compression de la moelle cervicale secondaire à une accumulation de GAG dans la dure-mère est parfois observée. Les premiers symptômes apparaissent habituellement entre 3 et 8 ans. La survie jusqu'à l'âge adulte est courante. L'atteinte cardiaque et l'obstruction des voies respiratoires sont responsables de la mortalité (Neufeld and Muenzer, 1995).

2.2.3 La maladie de Scheie

Elle représente la forme légère de la MPS I. Elle est caractérisée en particulier par une

raideur articulaire, une atteinte des valves cardiaques et une opacité de la cornée. Les enfants présentent une stature et une intelligence normale. Les premiers symptômes apparaissent habituellement après 5 ans et le diagnostic est établi entre 10 et 20 ans (Neufeld and Muenzer, 1995).

2.3 Diagnostic des MPS I :

Le diagnostic MPS est établi initialement à partir de signes cliniques (dysostoses, hépatosplénomégalie...) et radiographiques. Par la suite l'accumulation excessive de GAG peut être dosée de façon simple et peu coûteuse dans les urines (Jezyk *et al.*, 1982) par chromatographie sur couche mince ou par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) (Byers *et al.*, 1998). Un test enzymatique effectué à partir de sérum, leucocytes ou fibroblastes fourni le diagnostic MPS I (pour revue Haskins et Giger, 1997). Un enfant diagnostiqué à la naissance avec un déficit en Idua, peut développer une neurodégénérescence sévère, ou au contraire développer une forme plus modérée de la maladie où l'arthropathie prédomine. Le traitement envisagé pour le patient est différent selon la forme de MPS I dont il est atteint. La sévérité du syndrome Hurler nécessite de poser un diagnostic précoce afin de mettre en place rapidement un traitement pour le patient. Dans cette optique, un test permettant de distinguer les patients MPS I présentant des troubles neurologiques a été mis au point. Il mesure par spectrométrie de masse 15 oligosaccharides dérivés de l'héparane et dermatane sulfates dans des extraits de fibroblastes de patients MPS I. Parmi ceux-ci, deux trisaccharides sont corrélés avec la présence ou non de désordres neurologiques. Le ratio entre l'activité enzymatique et ces trisaccharides permet une discrimination claire entre les patients MPS I atteints de troubles neurologiques ou non (Fuller *et al.*, 2005).

2.4 L' α -L-Iduronidase humaine (Idua):

L'enzyme déficiente dans la MPS I, l' α -L-Iduronidase, est une hydrolase lysosomale. Elle hydrolyse les résidus acides α -L-iduronique des extrémités non réduites des dermatanes et héparanes sulfates. C'est un polypeptide de 653 acides aminés avec 6 sites de N-glycosylation qui donne un monomère de 74 kDa après clivage du peptide signal (Scott *et al.*, 1991). Comme toutes les enzymes lysosomales solubles, l' α -L-Iduronidase présente un résidu

mannose 6-phosphate permettant son adressage aux lysosomes (Myerowitz and Neufeld, 1981).

Le gène codant l' α -L-Iduronidase est localisé sur le chromosome 4p16.3 (Scott *et al.*, 1990). Ce gène de 19 kb est constitué de 14 exons ; un intron de 13 kb sépare le second et le troisième exon. Le gène Idua canin présente une structure semblable au gène Idua humain (Menon *et al.*, 1992).

Plus de 80 mutations ont été découvertes jusqu'à présent. Les trois allèles mutants, les plus fréquemment observés dans la population Européenne sont deux mutations non-sens (W402X et Q70X) et une mutation faux-sens (P533R) (Scott *et al.*, 1992). Aucun de ces 3 allèles ne permet la production d'une enzyme fonctionnelle. Associés de façon homozygote ou hétérozygote, ils aboutissent au syndrome Hurler, le plus sévère. D'autres mutations ont depuis été mis en évidence dans d'autres ethnies (dans la population arabe notamment – (Bach *et al.*, 1993). Il s'agit pour la plupart de délétion ou insertion aboutissant à la formation d'un codon stop prématuré. Dans les formes légère et modérée, Scheie et Hurler/Scheie, au moins un des allèles permet une activité enzymatique résiduelle.

2.5 Transport aux lysosomes :

Les hydrolases lysosomales sont synthétisées dans les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Puis elles sont transloquées dans la lumière du réticulum endoplasmique où sont ajoutés des oligosaccharides riches en mannose. Cette chaîne d'oligosaccharide est d'abord liée à une molécule donatrice lipidique, le dolichol phosphate. Le transfert est catalysé par une glycotransférase. Les oligosaccharides sont ensuite coupés (ils perdent trois résidus glucose et un résidu mannose), et la glycoprotéine est transportée à l'appareil de Golgi par transport vésiculaire. Plusieurs modifications post-traductionnelles vont y avoir lieu, aboutissant à l'ajout d'un marqueur mannose-6-phosphate par l'action de 2 enzymes. Ce résidu Man-6-P peut être reconnu par 2 types de récepteurs. Le premier est un petit récepteur cation dépendant (CD-MPR) et le second un grand récepteur cation indépendant (CI-MPR) (figure 13). Ils sont localisés dans le réseau trans-Golgien, dans les endosomes précoces et tardifs, et dans la membrane plasmique. Ils sont absents des lysosomes. Ils vont permettre le transport de l'enzyme de l'appareil de Golgi au compartiment

endosomal *via* des vésicules de clathrine (pour revue Haskins et Giger, 1997). Dans l'endosome tardif, le pH acide entraîne la dissociation des 2 récepteurs et de l'enzyme. Les récepteurs sont ensuite recyclés vers l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, tandis que l'enzyme est adressée au lysosome. Une faible fraction des hydrolases acides, environ 5 à 20% est sécrétée avant de parvenir aux lysosomes. L'enzyme sécrétée peut être internalisée et transférée aux lysosomes grâce aux récepteurs cation indépendant présents dans la membrane plasmique de nombreuses cellules, tels que les fibroblastes (Kaplan *et al.*, 1977; Distler *et al.*, 1979; Natowicz *et al.*, 1979) (figure 14). Ce mécanisme de sécrétion-captation est à la base des thérapies mises en place pour le traitement des maladies lysosomales. Une correction des lésions de surcharge a été observée sur des cultures de fibroblastes de patients Hurler (MPS I) et Hunter (MPS II), en co-cultivant les cellules de ces deux génotypes soient ensemble, soient avec des cellules normales (Fratantoni *et al.*, 1968).

2.6 Histopathologie

Le déficit en Idua entraîne une accumulation en héparane et dermatane sulfates dans les lysosomes. Au fur et à mesure de l'accumulation de ces substrats, les lysosomes s'arrondissent et augmentent de taille, les rendant visibles en microscopie optique. L'augmentation de la taille et du nombre des lysosomes peut gêner les autres structures cellulaires, et déformer les contours du noyau. L'hypertrophie des cellules conduit à l'organomégalie. Dans les cellules de la valve mitrale, l'accumulation des GAG dans les lysosomes conduit à un arrondissement des cellules, normalement fusiformes. Cela provoque un épaississement de la valve, interférant avec les fonctions cardiaques normales et produisant une sténose valvulaire (Haskins *et al.*, 2002). L'accumulation de GAG dans la cornée et la désorganisation du collagène qui en résulte sont à l'origine de l'opacité cornéenne (Mollard *et al.*, 1996; Alroy *et al.*, 1999).

Dans le cas de la MPS IH, des lésions de surcharge sont observées dans le système nerveux central. Les neurones présentent un gonflement des corps cellulaires secondaire à l'accumulation de GAG. La présence de méganeurites, de sphéroïdes axonaux (dilatation segmentaire axonale) et de bourgeonnement de neurites sont rapportés (Walkley *et al.*, 1991; Walkley, 1998, 2003). La plupart des astrocytes ont un noyau hypertrophié. Occasionnellement certains présentent un cytoplasme vacuolisé. Une accumulation de cellules

mononucléées est observée autour des vaisseaux intraparenchymateux et leptoméningés (Schull, 1983). L'épaississement des méninges consécutifs à une infiltration périvasculaires par des cellules mononucléées peut gêner la réabsorption du LCR dans les villosités arachnoïdiennes et entraîner l'hydrocéphalie (Fowler *et al.*, 1975; Van Aerde and Campbell, 1983).

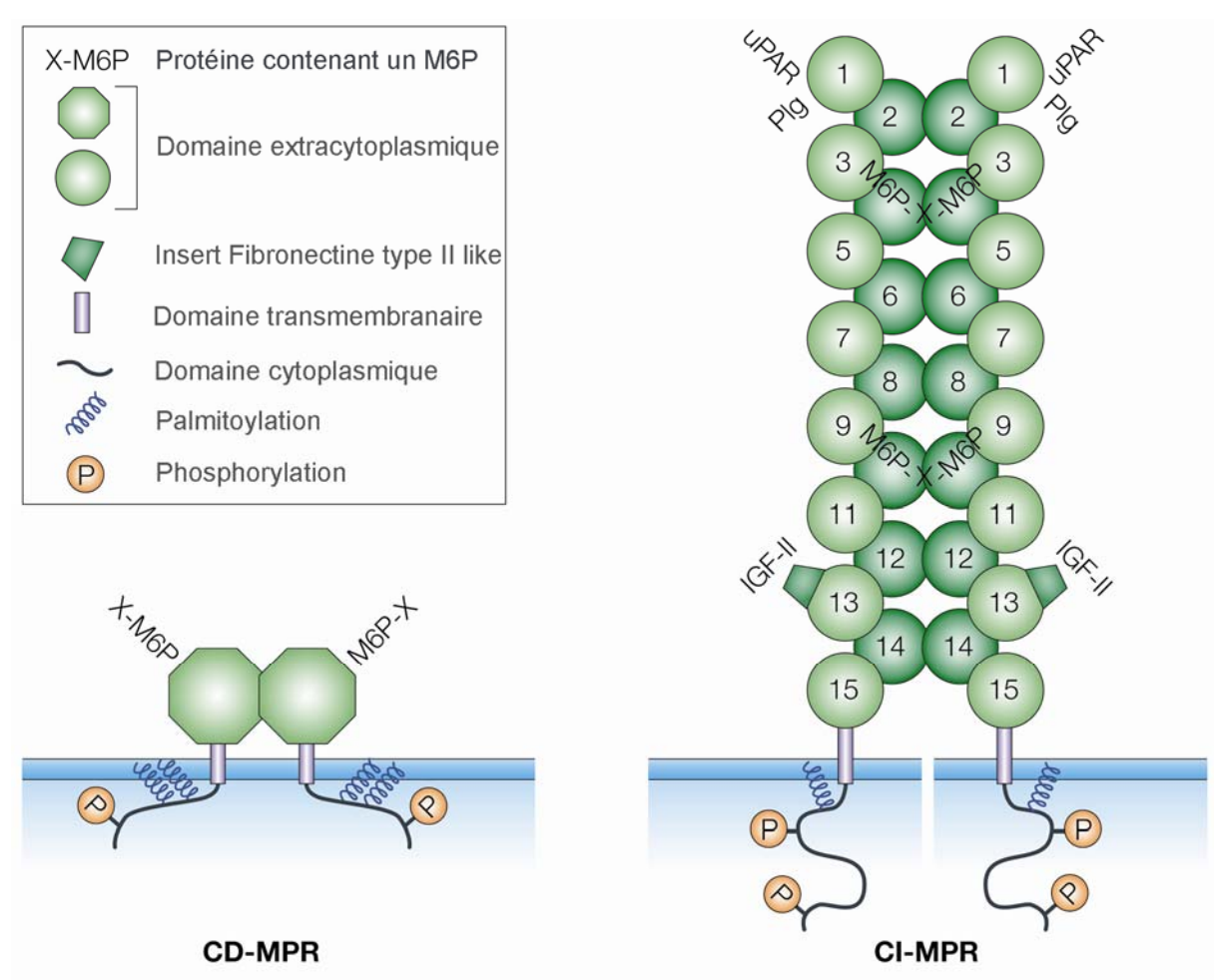
2.7 Dysfonctionnement secondaire dans le système nerveux central

Le déficit en Idua a comme conséquence directe une accumulation d'héparane et de dermatane sulfates dans les lysosomes. Cette accumulation des GAG dans les lysosomes entraîne un certain nombre d'évènements secondaires aboutissant au dysfonctionnement neuronal et à la mort cellulaire (figure 15). Ainsi il est observé une accumulation secondaire des gangliosides GM2 et GM3 dans les neurones, un transport intracellulaire anormal, une astroglie et une microglie, et une altération de la barrière hémato-encéphalique. La surcharge en gangliosides dans les MPS serait la conséquence d'une inhibition de la neuraminidase et d'autres enzymes lysosomales secondaires à l'accumulation de GAG (Kint *et al.*, 1973; Avila and Convit, 1975; Constantopoulos and Dekaban, 1978; Baumkotter and Cantz, 1983).

2.7.1 Modification secondaire d'autres enzymes lysosomales et de protéines lysosomales

Certaines enzymes lysosomales ont leur activité enzymatique augmentée (Neufeld and Muenzer, 1995). La β -hexoaminidase, la N-acétyl- β -glucosaminidase, la β -glucuronidase et la β -glucosaminidase sont augmentées dans le foie et le cerveau (Constantopoulos and Dekaban, 1978; Hultberg *et al.*, 1980), alors que l' α -galactosidase et l'arylsulfatase A ont leur activité diminuée dans le foie (Kint *et al.*, 1973). L' α -mannosidase est augmentée dans le foie et la rate de chiens MPS I, mais reste à un niveau normal dans le cerveau et les reins. La β -galactosidase est elle diminuée chez les chiens MPS I (Shull *et al.*, 1984). L'hyperactivité enzymatique secondaire peut être due à une régulation positive des enzymes dans les voies affectées, soit pour compenser l'activité de l'enzyme déficiente, soit à cause d'une hypertrophie du système lysosomal (Winchester, 2001).

Figure 13 : Structure des récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR)

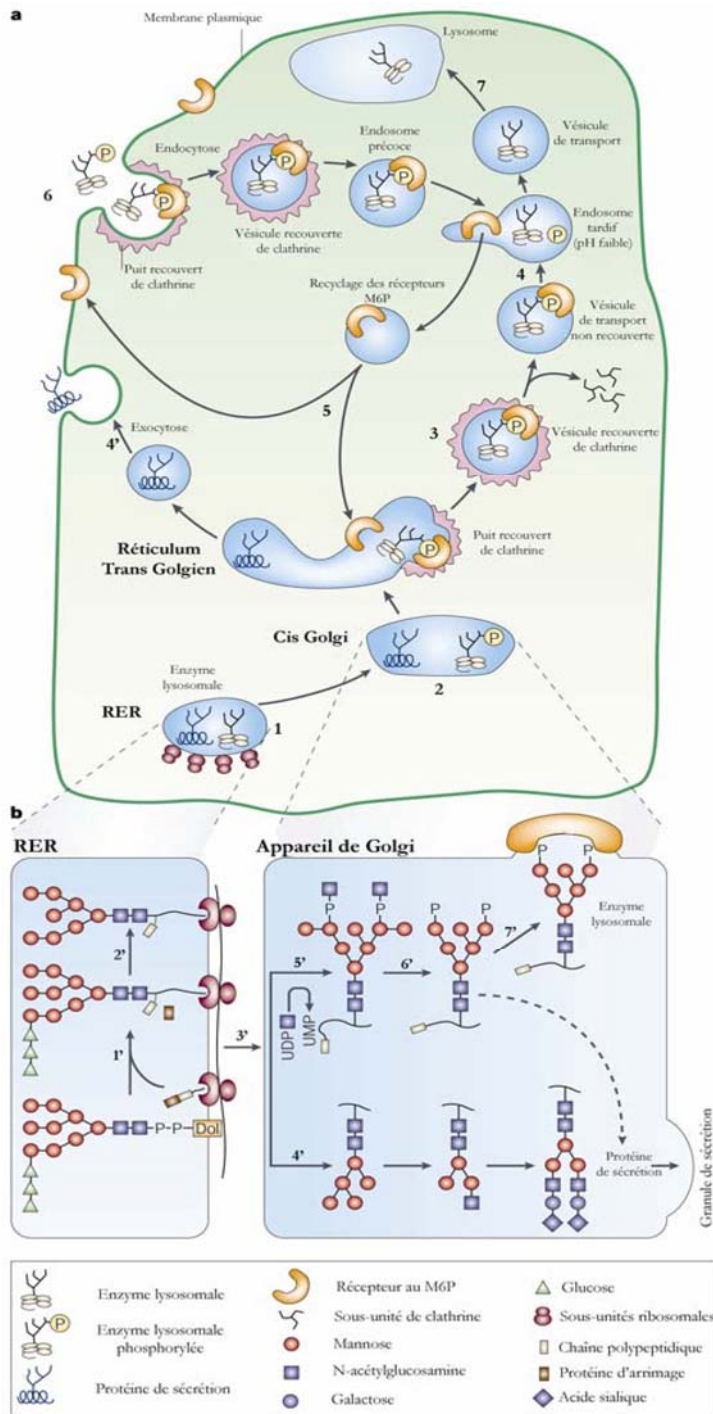


Adapté de Ghosh *et al.*, 2003.

Les récepteurs au mannose-6-P (MPR) sont des glycoprotéines de type I. Le récepteur au mannose-6-P (M6P) cation dépendant (CD-MPR) est présent principalement dans les membranes sous forme d'homodimère. Il ne possède qu'un seul site de fixation au M6P par polypeptide. Le récepteur au M6P cation indépendant (CI-MPR) est présent dans les membranes sous forme de dimère. Diverses modifications post-traductionnelles des MPR se produisent incluant une palmitoylation et une phosphorylation.

uPAR, récepteur à l'urokinase (activateur du plasminogène); IGF-II, insulin-like growth factor; Plg, plasminogène.

Figure 14 : Biosynthèse et transport des enzymes lysosomales aux lysosomes



Adapté des Desnick et Schuchman, 2002.

(a) : 1 : traduction en protéines des ARN messagers dans le réticulum endoplasmique ; 2 : dans l'appareil de Golgi : glycosylation et synthèse du marqueur de reconnaissance au mannose-6-phosphate ; 3 : transfert vers le lysosome par l'intermédiaire de récepteurs au mannose-6-phosphate en passant par des compartiments intermédiaires (vésicules de clathrine et endosomes) ; 4 : les enzymes sont libérées de leur récepteur en milieu acide ; 5 : les récepteurs sont recyclés vers l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique ; 6 : environ 10% des enzymes lysosomales sont normalement excrétées dans le milieu extracellulaire et peuvent être internalisées par endocytose par les cellules avoisinantes grâce à la présence sur ces cellules de récepteurs au mannose-6-phosphate ; 7 : transport des enzymes aux lysosomes. (b) : dans le RER, 1' : glycosylation des enzymes lysosomales par transfert en bloc d'un oligosaccharide préformé lié au dolichol ; 2' : perte de 3 résidus glucose et d'un résidu mannose ; 3' : transport des enzymes dans l'appareil de Golgi ; 4' : séparation des enzymes lysosomales des protéines de sécrétion et des protéines intégrantes de la membrane plasmique ; 5' et 6' : acquisition du signal de reconnaissance mannose-6-phosphate par l'action séquentielle de la phosphotransférase et la phosphodiesterase ; 7' : les enzymes phosphorylées se lient aux récepteurs au mannose-6-phosphate associés aux vésicules recouvertes de clathrine qui bourgeonnent à partir de la membrane de l'appareil de Golgi. M6P : mannose-6-phosphate ; RER : réticulum endoplasmique rugueux.

Egalement, dans des cerveaux de patients atteints de MPS I, une augmentation d'un facteur trois du peptide beta-amyloïde cytoplasmique par rapport à des cerveaux normaux est observée (Ginsberg *et al.*, 1999). L'accumulation de GAG associée à une accumulation du peptide beta-amyloïde contribue au dysfonctionnement et à la mort des cellules affectées dans ces maladies, mais n'entraîne pas la formation de plaques séniles comme dans la maladie d'Alzheimer.

Une augmentation de différentes cathepsines a été décrite dans un modèle murin MPS I (Ohmi *et al.*, 2003). Ces cathepsines sont exprimées dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage suggérant leur implication dans l'inflammation du SNC. Egalement, il est reporté une augmentation des protéines lysosomales LAMP-1 et LAMP-2 dans le sérum des patients due à l'hypertrophie du système lysosomal. Ces protéines peuvent servir de marqueur potentiel pour le diagnostic à la naissance (Meikle *et al.*, 1997; Hua *et al.*, 1998).

2.7.2 Accumulation secondaire des gangliosides

Les gangliosides sont des glycosphingolipides constitués d'un céramide hydrophobe (N-acylsphingosine) et d'une chaîne oligosaccharidique hydrophile portant un ou plusieurs résidus acide N-acétylneuraminique. Ils sont ancrés à la membrane plasmique par leur extrémité céramide hydrophobe, la chaîne oligosaccharidique hydrophile se retrouve dans l'espace extra-cellulaire (Thompson and Tillack, 1985). La majorité des gangliosides a été trouvée dans la substance grise du cerveau. Les gangliosides sont très concentrés dans la membrane plasmique des neurones, spécialement au niveau des terminaisons nerveuses et des dendrites (Hansson *et al.*, 1977; Ledeen, 1978). Ils sont dégradés dans les lysosomes. Ils sont vraisemblablement impliqués dans la différenciation cellulaire et les interactions cellule/cellule, et participent à la croissance des neurites (Purpura and Suzuki, 1976).

Les concentrations élevées de GM2 et GM3 observées chez ces patients, confortent l'hypothèse du rôle de ces substances dans la croissance ectopique de neurites. L'apparition de nouveaux neurites et de leurs synapses joue un rôle dans les dysfonctionnements du SNC observés dans la MPS I H. Vraisemblablement ce n'est pas l'accumulation des gangliosides dans les vacuoles qui est responsable de la neuritogénèse. Cette accumulation reflète plutôt un métabolisme anormal des gangliosides, et une altération de leur répartition normale au sein de

la membrane plasmique neuronale. Les mécanismes par lesquels ils pourraient agir comme des facteurs permettant la croissance des neurites ne sont pas vraiment documentés. Ils pourraient agir comme des récepteurs pour des facteurs de croissance (Roisen *et al.*, 1981).

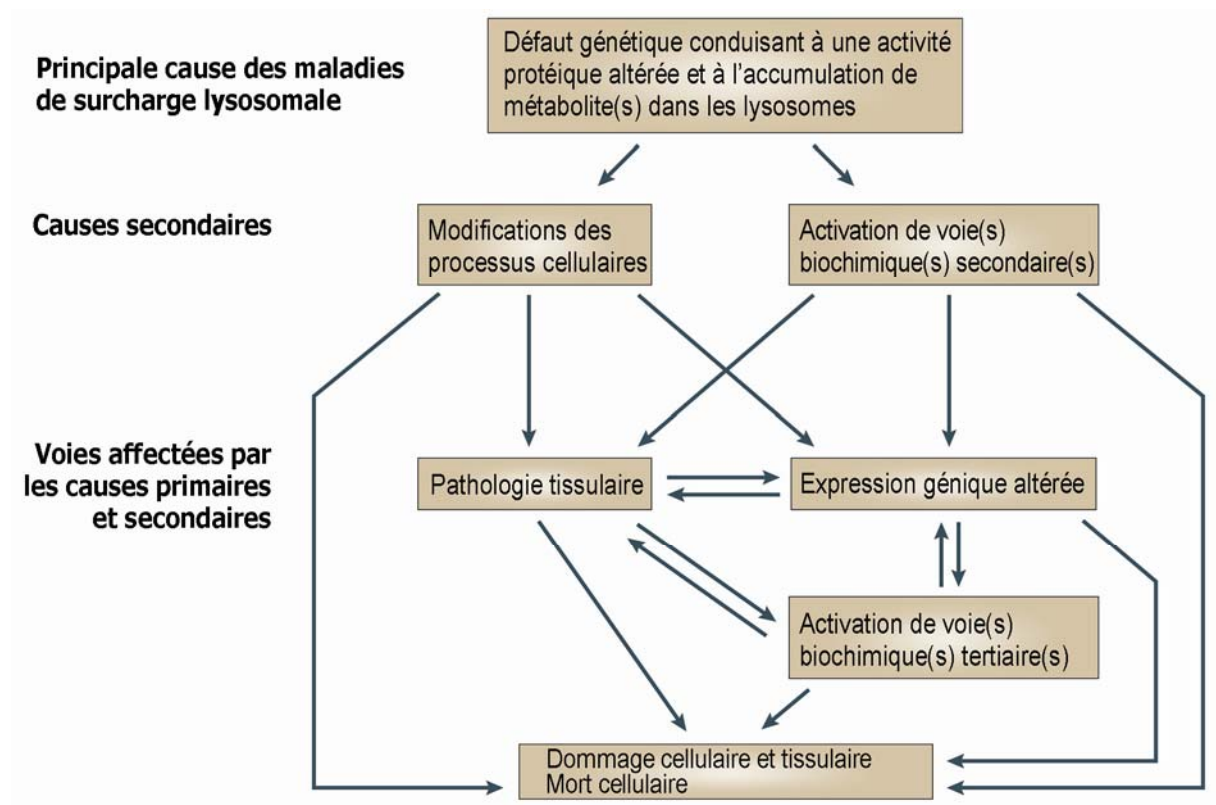
2.7.3 Activation de la microglie et astroglie

La microglie dérive de précurseurs sanguins qui sont capables de passer la barrière hématoencéphalique et peuvent rester dans le parenchyme à l'état inactivé, constituant la microglie résidente. Le rôle de ces cellules est de surveiller et défendre le système nerveux contre toutes agressions. Quand une lésion a lieu, des cytokines et des chémokines sont produites par la microglie résidente active pour augmenter le recrutement de précurseurs sanguins sur le lieu de la lésion et également produire des cytokines proinflammatoires cytotoxiques conduisant à la mort cellulaire. Cette activation de la microglie a lieu dans les maladies de surcharge lysosomales suite aux lésions de surcharge (Ohmi *et al.*, 2003; Proia and Wu, 2004) (figure 16).

2.8 Les modèles animaux

La MPS I a été décrite chez trois modèles animaux : le chat, le chien et la souris (Haskins *et al.*, 1979; Shull *et al.*, 1982; Spellacy *et al.*, 1983; Clarke *et al.*, 1997). Les 2 premiers modèles sont des maladies naturelles, alors que le modèle murin a été obtenu après une interruption sélective du gène codant pour l'Idua. Ces modèles animaux ont des lésions similaires à celles observées chez l'enfant MPS I. Les signes cliniques apparaissent environ quatre mois après la naissance chez les animaux de grande taille. Chez les animaux sévèrement affectés, la mort peut avoir lieu avant le sevrage.

Figure 15 : Voies potentiellement impliquées dans la pathologie des maladies de surcharge lysosomale



Adapté de Futerman *et al.*, 2004.

Les maladies de surcharge lysosomale sont toutes caractérisées par une accumulation de métabolites non dégradés dans les lysosomes. Cependant la variété des symptômes indique qu'un certains nombres de voies biochimiques secondaires et de voies cellulaires sont activées. Il semblerait que l'accumulation de métabolites non dégradés affectent des voies cellulaire ou biochimiques secondaires aboutissant à des pathologies tissulaires, une expression altérée de certains gènes et à l'activation de voies biochimiques tertiaires.

2.8.1 Le modèle félin

Le premier modèle de MPS I a été décrit chez un chat domestique à l'université de Pennsylvanie en 1979 (Haskins *et al.*, 1979). La mutation observée dans le modèle félin est une délétion de 3 paires de base sur le gène *Idua* conduisant à la perte d'un résidu aspartate conservé (He *et al.*, 1999). Les chats MPS I présentent une dysmorphie faciale, une dysostose multiple, une opacité cornéenne, et un souffle cardiaque (Ellinwood *et al.*, 2004).

L'examen histopathologique montre des lésions de surcharge présentes dans les neurones, les granulocytes neutrophiles périphériques, les hépatocytes, dans les cellules de la rate, du foie, des reins et de la valve mitrale (Haskins *et al.*, 1982). De plus, le métabolisme des gangliosides GM2 et GM3 ne semblent pas être affecté à la différence des autres modèles animaux ou de l'homme (Haskins *et al.*, 1982). Les chats affectés ont une espérance de vie assez longue et sont fertiles. Le phénotype des chats MPS I est classé intermédiaire entre les formes MPS IH et MPS IS.

2.8.2 Le modèle canin

La maladie a été décrite chez des chiens de chasse Plott en 1984 (Shull *et al.*, 1984). Les chiens MPS I présentent une mutation ponctuelle au niveau du site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène *Idua*. L'ADNc canin a été isolé (Stoltzfus *et al.*, 1992). La mutation qui change le site d'épissage conservé GT en AT empêche l'épissage de l'intron 1, et crée un codon stop à la jonction exon/intron provoquant la synthèse d'un polypeptide de 51 acides aminés. Ce petit polypeptide ne peut pas être transloqué dans le réticulum endoplasmique puisque 64 acides aminés sont nécessaires pour ce processus (Okun *et al.*, 1990). Les chiens homozygotes pour cette mutation ne présente aucune activité enzymatique. Ils développent une maladie similaire à la forme intermédiaire humaine de Hurler/Scheie. Les signes cliniques majeurs apparaissent vers 6 mois et sont progressifs. Il s'agit d'un ralentissement de la croissance, d'une opacité cornéenne, et d'anomalies sévères du squelette. Une accumulation de GAG (Héparane et dermatane sulfate) est observée dans tous les tissus, y compris le SNC (Shull *et al.*, 1982; Spellacy *et al.*, 1983; Shull *et al.*, 1984). Les chiens présentent également une accumulation secondaire de certains gangliosides (GM2, GM3 et GD3) principalement

dans la substance grise (Shull *et al.*, 1984; Constantopoulos *et al.*, 1985), ainsi qu'une dendritogénèse excessive (Walkley, 2003).

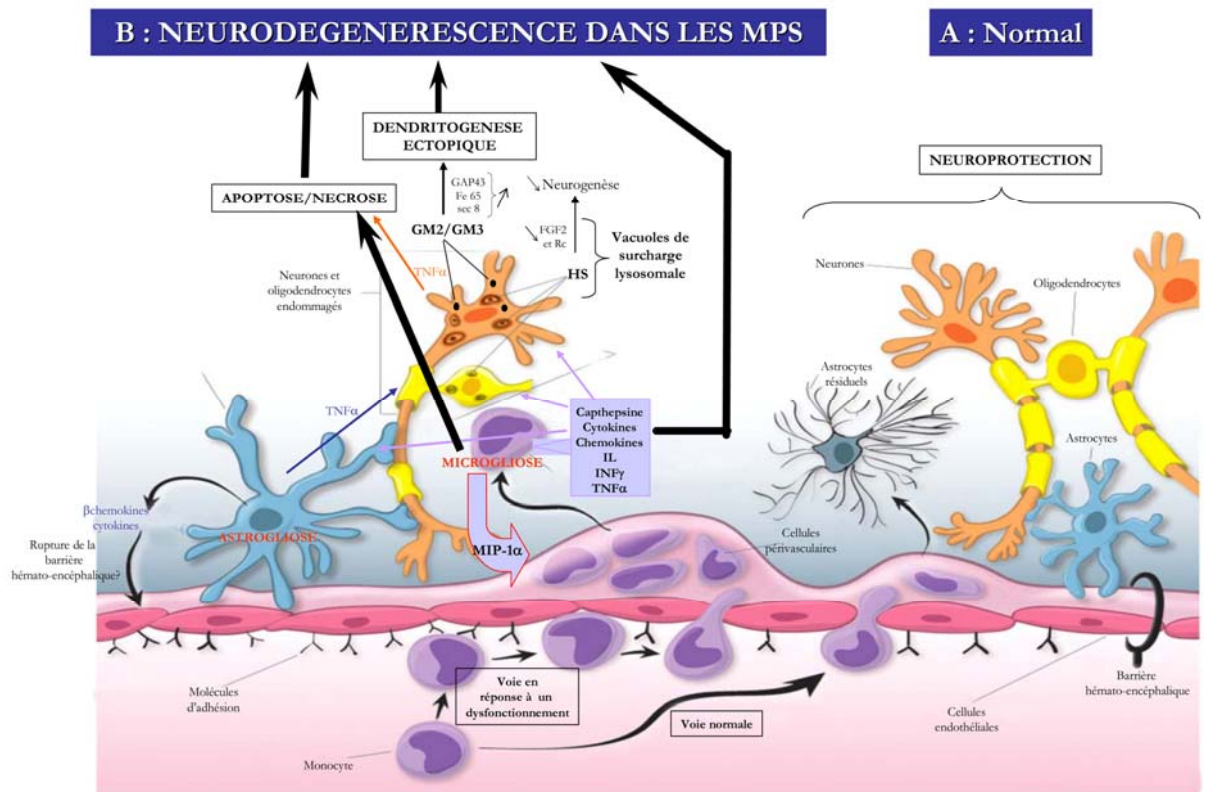
2.8.3 Le modèle murin

Les souris MPS I *knock-out* (KO) montrent une absence d'activité enzymatique Idua, et une augmentation des GAG excrétés dans les urines. Ce modèle correspond à la forme la plus sévère, c'est-à-dire au syndrome Hurler. Bien que normales à la naissance, ces souris présentent, à trois semaines, un museau trapu et des pattes palmées. Il n'y a pas de retard de croissance évident, ni mort prématurée avant la vingtième semaine. Une dysostose osseuse généralisée apparaît vers la quinzième semaine.

Les lésions de surcharge sont d'abord observées dans les cellules réticuloendothéliales à quatre semaines, puis dans les hépatocytes, les chondrocytes, les neurones, et les cellules épithéliales rénales à huit semaines (Clarke *et al.*, 1997). La sévérité des lésions augmente avec l'âge de la souris.

Les souris KO présentent une augmentation des concentrations en gangliosides GM2 et GM3 (Russell *et al.*, 1998). Une microgliose précoce et une astrogliose ont été décrites dans le cerveau de ces souris ; elles sont associées à une surexpression des gènes impliqués dans le processus inflammatoire (Ohmi *et al.*, 2003). A la différence des modèles félin et canin, il n'y a pas de dendritogénèse ectopique (Walkley, 2003)

Figure 16 : Modèle hypothétique du dysfonctionnement du SNC dans les mucopolysaccharidoses



Modifié et complété à partir de Priora et Wu 2004.

A : Dans les conditions normales, la microglie et les macrophages du SNC sont dérivés des précurseurs du système circulatoire. Ils passent la barrière hémato-encéphalique à travers les régions périvasculaires et finalement restent dans le parenchyme comme cellules ramifiées résiduelles. B : Quand une lésion se produit dans le SNC, des cytokines et des chémokines sont produites à partir des cellules microgliales, des macrophages et des astrocytes, lesquels stimulent une surexpression des molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales du SNC, entraînant une migration transendothéliale des monocytes sanguins dans les régions périvasculaires. Dans les maladies de surcharge, les cellules déficitaires en enzymes, en particulier les macrophages et les monocytes, peuvent également migrer du sang dans le parenchyme où ils peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires conduisant à une inflammation et une mort cellulaire.

3 Approches thérapeutiques dans la mucopolysaccharidose de type I

Plusieurs approches thérapeutiques peuvent être envisagées pour traiter les patients atteints de MPS I. La première est symptomatologique. Le traitement ne corrige pas le déficit primaire de la maladie mais améliore le confort de vie des malades. Les autres traitements, quant à eux, cherchent à corriger le déficit en Idua. Il s'agit soit d'apporter la protéine manquante par enzymothérapie ou greffe de moelle osseuse, soit de corriger le gène à l'origine du déficit. Ces traitements utilisent une propriété spécifique des enzymes lysosomales : la sécrétion-captation ou correction croisée (cf. § *transport aux lysosomes*). Les enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire peuvent, *via* les récepteurs au mannose-6-phosphate, être internalisées par d'autres cellules, et être transportées aux lysosomes où elles sont fonctionnelles.

3.1 Traitements symptomatiques et palliatifs

Le principal objectif de ces traitements est d'améliorer le confort de vie des malades. Ils sont mis en place pour les patients ne pouvant bénéficier des autres traitements existants (patients trop âgés, autres traitements non adaptés, etc).

Des interventions chirurgicales de l'oreille, de la gorge, ou du nez peuvent améliorer la surdité et les atteintes des voies respiratoires. Les atteintes squelettiques nécessitent un suivi orthopédique. Certains patients développent des décompensations cardiaques secondaires aux lésions des valves et une chirurgie de la valve peut être nécessaire (Fischer *et al.*, 1999). L'opacité de la cornée peut interférer avec la vision nécessitant une transplantation cornéenne. L'hydrocéphalie peut conduire à l'implantation d'un système de dérivation ventriculo-péritonéale et à une laminectomie cervicale pour décompresser la moelle épinière (Shinnar *et al.*, 1982; Kachur and Del Maestro, 2000).

3.2 Thérapie systémique

3.2.1 Enzymothérapie substitutive

L'enzymothérapie substitutive a été proposée pour traiter les patients atteints de maladies de surcharge lysosomale. La découverte du phénomène de correction croisée a joué un rôle clé dans le développement de traitements par substitution enzymatique (Fratantoni *et al.*, 1968).

Dans ce traitement, l'enzyme humaine recombinante (laronidase, Aldurazyme®) est administrée par voie intraveineuse dans tout l'organisme. La demi-vie de la laronidase a été déterminée à 5-7 jours dans des fibroblastes humains en culture. Ces données *in vitro* ont permis d'établir un protocole d'administration hebdomadaire de la laronidase (Taylor *et al.*, 1991; Kakkis *et al.*, 1994). Suite aux études *in vitro*, ce traitement a été testé sur différents modèles animaux.

3.2.1.1 Les études pré-cliniques

La première évaluation préclinique de l'inocuité et de l'efficacité thérapeutique de l'enzymothérapie substitutive a été effectuée chez le chien MPS I en 1994 (Shull *et al.*, 1994). L'enzyme humaine recombinante a été administrée chez ces chiens MPS I par voie intraveineuse toutes les semaines pendant trois mois à une dose de 1mg par kg (soit 25000 unités). Très rapidement l'enzyme disparaît du sérum et est internalisée dans les tissus. Une activité enzymatique normale a été détectée après trois mois dans le foie et la rate. Une activité plus faible mais significative a été trouvée dans les poumons et les reins. Des anticorps dirigés contre l'Idua ont été détectés chez tous les animaux quelques semaines après le début du traitement sans interférer avec l'activité enzymatique. Une correction des lésions de surcharge a été observée en microscopie électronique dans le foie, la rate, les poumons et les reins. Aucune amélioration n'a été observée dans le cœur, le SNC et la cornée.

Dans une seconde étude, des doses plus élevées (0,5 mg/ kg soit 125000 unités) ont été administrées chez des chiens MPS I tous les 2 jours pendant 10 jours (Kakkis *et al.*, 1996). Cette étude a montré une activité enzymatique plus élevée dans le foie, la rate, les poumons et

les reins avec une réduction similaire des lésions de surcharge par rapport aux infusions à faible dose. Une légère activité enzymatique (0,84% de l'activité enzymatique normale dans le cervelet) ainsi qu'une diminution de la concentration en GAG ont été détectées dans le cerveau. Aucune correction des lésions de surcharge n'a cependant été mise en évidence dans le SNC, les cartilages et le cœur. Des anticorps ont également été détectés chez tous les chiens traités associés à la présence d'immuns-complexes et à une protéinurie.

Pour prévenir une réponse immune forte contre l'Idua, une méthode de tolérisation immune a été développée chez les chiens MPS I. Cette méthode est basée sur l'injection d'immunosuppresseurs (cyclosporine A et azathioprine) pendant 60 jours en association avec l'infusion d'enzyme à faible dose. Cette méthode de tolérisation a permis de minimiser la réponse immunitaire sur plus de six mois (Kakkis *et al.*, 2004a). Des études effectuées chez le rat sain (Turner *et al.*, 2000), et le chat MPS I (Kakkis *et al.*, 2001b) ont montré des profils de distribution enzymatique identique à celui des chiens MPS I, avec une majorité d'enzyme distribuée dans le foie.

Les études préliminaires effectuées sur les chiens MPS I montrent qu'aucun bénéfice clinique ne peut être espéré sur les troubles neurologiques. L'enzyme recombinante ne traverse pas la barrière hématoencéphalique limitant ainsi son utilisation au traitement de patients n'ayant pas d'atteintes du SNC. Même dans le cas de troubles neurologiques, l'enzymothérapie peut être mis en place dès le diagnostic établi, en attendant un donneur compatible pour la greffe de moelle osseuse. Ce traitement pré-greffe permet une amélioration physique, notamment au niveau cardiaque et respiratoire, rendant la suite de la procédure plus facile à tolérer pour le patient. L'enzymothérapie peut même être bénéfique si elle est continuée après la greffe. Cependant cela soulève d'autres problèmes liés au coût important d'un tel traitement (Wraith, 2001).

La barrière hématoencéphalique empêchant le passage de la protéine recombinante, l'administration de la protéine directement dans le LCR de chiens MPS I a été testée (Kakkis *et al.*, 2004b). L'enzyme a été administrée par voie intrathécale (~ 1mg) une fois par semaine pendant 4 semaines. Les résultats montrent une augmentation de l'activité enzymatique dans le cerveau, la moelle épinière et les méninges à des niveaux correspondant respectivement à 23, 13 et 300 fois l'activité normale. Une diminution de la concentration en GAG est observée dans tous ces tissus. Tous les chiens ont développé une réponse immunitaire dose dépendante

dirigée contre l'Idua, ainsi qu'une infiltration lymphocytaire dans les méninges. Ces résultats doivent être confirmés sur une étude à long terme.

3.2.1.2 Les essais cliniques

➤ Phase I/II

Un essai clinique a été initié en 2001 sur des patients MPS I dans le but d'évaluer la sécurité et l'efficacité du traitement par substitution enzymatique (Kakkis *et al.*, 2001a). Dix patients âgés de 5 à 22 ans ont été inclus dans cette étude : huit étaient atteints du syndrome Hurler/Scheie, un du syndrome Scheie et le dernier du syndrome Hurler. Ils ont reçu l'enzyme par voie intraveineuse à une dose de 125000 U par kg une fois par semaine pendant 52 semaines. Un traitement antihistaminique préventif leur a été administré avant le début de l'enzymothérapie. Les infusions d'enzyme recombinante ont été bien tolérées. Cinq patients ont présenté un urticaire, et quatre une activation du complément. Des anticorps dirigés contre l'Idua ont été détectés chez quatre patients, sans pour autant interférer avec le traitement. Une réduction de l'hépatosplénomégalie a été observée chez les patients, ainsi qu'une diminution de la concentration en GAG dans les urines. Ces patients présentent également une amélioration de leur condition physique, de la mobilité articulaire, et une augmentation du poids et de la taille. Une amélioration des fonctions cardiaques a été également notée. Ces patients ont été réévalués récemment, 6 ans après le début du traitement (Sifuentes 2006 – *on press*). La maladie n'a pas progressé. Les améliorations observées au début du traitement restent identiques. Le traitement a permis de stabiliser ou de corriger complètement les atteintes tissulaires.

➤ Phase III

Un essai de phase III, international, a été commandité par 2 sociétés pharmaceutiques, BioMarin (Novato, Californie, USA) et Genzyme (Cambridge, Massachusetts). Il a été organisé en coordination avec 5 sites européens et un site américain. Il est effectué en double aveugle sur 45 patients dont l'âge moyen est de 15 an et demi et présentant une forme intermédiaire de la maladie ; 22 ont reçu 100 unités/kg de l'enzyme recombinante et 23, un

traitement placebo pendant 26 semaines toutes les semaines. Le bénéfice du traitement a été évalué tous les mois par différents critères : physique (test de force, de marche), clinique (taille du foie) et biochimique (concentration des GAG dans les urines). Tous les patients traités avec l'enzyme recombinante ont présenté une augmentation de leur force physique et de leur capacité de marche, une réduction de la taille du foie et une diminution de la concentration en GAG dans les urines. Une amélioration de l'apnée du sommeil est également notée (Wraith *et al.*, 2004).

3.2.1.3 Pratique clinique

L'utilisation de la Laronidase a été approuvée par la « Food and drug administration » en 2003 aux Etats-Unis, ainsi qu'en Europe et dans d'autres pays. Elle est administrée aux patients une fois par semaine à une dose de 100 U/kg (0,58 mg/kg), avec un traitement prophylactique dans le cas de réactions à l'administration (pour revue (Wraith *et al.*, 2005).

Les seuls risques significatifs de l'enzymothérapie sont de nature immunologique. Aucun des patients MPS I traités n'a eu de réaction anaphylactique à la suite de l'infusion. Les réactions observées ont pu être réduites après administration d'anti-histaminiques et en ralentissant la vitesse d'infusion de l'enzyme. La réponse humorale développée contre l'enzyme recombinante n'a eu qu'un impact minimal sur l'efficacité clinique et l'excrétion des GAG dans les urines (Wraith *et al.*, 2005). De plus certains patients présentant initialement une réponse immune contre l'Idua ont développé une tolérance au bout de 2 ans de traitement (Kakavanos *et al.*, 2003). On ne peut pas exclure cependant que ces réponses immunitaires, bien que modérées chez ces patients, deviennent plus fortes dans le cas de patients atteints de formes plus sévères. Les patients atteints du syndrome Hurler ne présentent aucune activité enzymatique, et donc en théorie le risque immunologique lié à l'apport d'une protéine exogène devrait être plus important.

3.2.2 Greffe de moelle osseuse

La greffe de moelle osseuse vise à reconstituer le système hématopoïétique d'un malade avec les cellules souches d'un donneur sain immuno-compatible. Les macrophages

mutés sont remplacés par ceux du donneur sain constituant ainsi une source d'enzyme capable de corriger différents sites de leur surcharge. Ainsi les macrophages peuvent migrer jusqu'au foie, aux poumons, au péritoine et éventuellement au niveau des os et du SNC (Hoogerbrugge *et al.*, 1995).

La greffe de moelle osseuse allogénique permet une amélioration radicale des symptômes cliniques chez les patients MPS I atteints de la forme intermédiaire (Hobbs *et al.*, 1981). Depuis de nombreux patients ont été traités par greffe de moelle osseuse. Le niveau d'activité enzymatique dans les leucocytes du donneur reste à un niveau normal plus d'un an après la greffe, et aussi longtemps que celle-ci est maintenue (Krivit 1991). La concentration en GAG dans les urines et le LCR diminue à un niveau normal quelques mois après la greffe. Ce traitement permet une amélioration significative de toutes les atteintes somatiques chez les patients MPS IH. Une amélioration des fonctions cardiaques a été montrée chez des patients MPS IH plus de 10 ans avec la transplantation (Braunlin *et al.*, 2003).

Ce traitement permet également de corriger partiellement les déficits enzymatiques du cerveau, probablement grâce à la migration des cellules de la lignée monocyttaire/macrophagique du donneur dans le SNC. Aucune correction histologique n'est cependant observée dans le SNC bien que les performances dans les tests d'apprentissage soient améliorées. L'amélioration de la vision, de l'ouïe, de la mobilité articulaire, des fonctions cardiaques et respiratoires pourraient jouer un rôle dans l'amélioration des fonctions intellectuelles des patients MPS IH greffés. Ce traitement doit être effectué assez précocement dans le développement de la maladie, c'est-à-dire avant que les atteintes somatiques et cérébrales ne soient trop sévères. Si la greffe est effectuée avant l'âge de 2 ans, l'hydrocéphalie est améliorée, l'IRM montre une bonne myélinisation, et le QI des patients est maintenu (Hugh Jones 1989).

La greffe de moelle osseuse est cependant limitée par la difficulté à trouver des donneurs HLA identiques. Elle nécessite également la mise en place d'un traitement immunosuppresseur. Un rejet du greffon contre l'hôte (GVH) est observé dans 10 à 15% des cas. Le décès survient dans 10 à 20% des cas (Hoogerbrugge *et al.*, 1995). De nombreuses familles refusent la greffe de moelle à cause des risques élevés de mortalité et de morbidité.

3.2.3 Greffe de sang de cordon

La greffe de sang de cordon ombilical est aussi efficace que la greffe de moelle osseuse (Staba *et al.*, 2004). Vingt patients âgés de 16 mois et atteints de la forme sévère ont reçu une greffe de sang de cordon de donneurs non apparentés. Ils ont reçu au préalable une chimiothérapie, mais à la différence de la greffe de moelle osseuse, n'ont pas été irradiés. Deux ans après la greffe, 85% des enfants survivent avec un chimérisme total du donneur et une activité enzymatique normale dans le sang périphérique. Une diminution des symptômes organiques de la maladie, un arrêt des anomalies squelettiques et une stabilisation ou amélioration des fonctions cognitives sont observées.

L'avantage de cette transplantation par rapport à la greffe de moelle osseuse est qu'un donneur histo-compatible n'est pas nécessaire et que le rejet du greffon contre l'hôte (GVH) est faible.

3.3 Thérapie par transfert de gène

Les maladies de surcharge lysosomale, y compris la MPS I, sont des candidates idéales pour une thérapie par transfert de gène. Une activité enzymatique faible est suffisante dans les cellules pour corriger les défauts métaboliques de ces maladies. Une activité enzymatique β -glucuronidase inférieure ou égale à 1% de l'activité normale permet une correction des lésions de surcharge chez des souris MPS VII (Wolfe *et al.*, 1992; Daly *et al.*, 1999).

3.3.1 Transfert de gène *ex vivo*

Cette technique consiste à prélever des cellules dans l'organisme, à les modifier génétiquement avec un vecteur porteur du gène thérapeutique puis à les réintroduire chez le patient. Les cellules les plus souvent utilisées comme cible thérapeutique sont les cellules progénitrices hématopoïétiques. Ces cellules génétiquement modifiées sont capables de fournir une source d'enzyme pouvant être sécrétée dans la circulation. Elles peuvent également coloniser différents organes et ainsi y apporter directement l'enzyme.

La transplantation de cellules hématopoïétiques autologues génétiquement modifiées offre deux avantages par rapport à la greffe de moelle osseuse : elle permet d'éliminer le problème d'histocompatibilité et apporte des concentrations d'enzymes plus élevées. Les cellules hématopoïétiques peuvent être transduites *in vitro* avec un vecteur rétroviral murin portant l'ADNc de l'Idua et secrètent de l' α -L-Iduronidase qui peut être internalisée par des fibroblastes de patients Hurler (Huang *et al.*, 1997b) et des macrophages (Fairbairn *et al.*, 1996). Une activité enzymatique 10 à 200 fois supérieure à la normale est mesurée *in vitro* dans des cellules hématopoïétiques canines Idua^{-/-} transduites par un vecteur rétroviral murin porteur de l'ADNc de l'Idua canine (Lutzko *et al.*, 1999a). Les premiers essais de transplantation de ces cellules dans un modèle canin MPS I non irradiés n'ont pas été aussi concluants. Aucune activité enzymatique n'a été détectée. Une réponse immunitaire humorale contre l'Idua et une réponse cellulaire dirigée contre les cellules transduites ont été mises en évidence chez ces animaux. Afin d'éliminer cette réponse immunitaire, certains chiens ont reçu un traitement immunosuppresseur post-greffe. A nouveau aucune activité enzymatique n'a été détectée. Cette absence d'expression n'est donc pas exclusivement liée à l'existence d'une réponse immune. Elle est également due à l'extinction de l'activité transcriptionnelle du promoteur du virus leucémogène murin de Moloney utilisé dans ces études. Cette hypothèse a été confirmée dans une autre étude après injection *in utero* d'un vecteur rétroviral murin (Meertens *et al.*, 2002).

Zheng et ses collaborateurs ont, eux, utilisés un modèle murin MPS I pour tester l'efficacité de la transplantation de cellules hématopoïétiques génétiquement modifiées en comparaison avec la greffe de moelle osseuse (Zheng *et al.*, 2003). Ils ont utilisé un vecteur rétroviral porteur de l'ADNc de l'Idua humaine pour transduire la moelle osseuse de souris mâle Idua^{-/-} et les ont transplantées dans des souris femelles irradiées Idua^{-/-}. D'autres souris femelles mutantes ont reçu, elles, une greffe de moelle osseuse. L'efficacité des deux types de traitement a été comparée sur la base de 3 paramètres biochimiques : l'expression d' α -L-Iduronidase, la réduction de l'activité β -hexosaminidase et la diminution de la concentration en GAG, dans 4 tissus (le foie, la rate, les reins, et le cerveau). Les souris mutantes ayant reçu la greffe de moelle osseuse présentent une correction de la pathologie dans le foie et la rate seulement, alors que celles transplantées avec les cellules génétiquement modifiées présentent une correction dans les 4 tissus analysés. La microscopie électronique montre la présence de neurones normaux dans le cortex des souris transplantées. L'effet thérapeutique est attribué à la migration de cellules hématopoïétiques (de la lignée monocyte/macrophage) dans le

cerveau. Cela a été confirmé par la présence de microglie normale dans le cortex des souris traitées ainsi que par la présence de cellules mâles (toutes les souris receveuses sont des souris femelles).

Le transfert de gène *ex vivo* a également été testé sur d'autres cibles cellulaires, telles que les cellules souches mésenchymateuses. Ce sont des cellules progénitrices multipotentes pouvant participer à l'élaboration de nombreux tissus. Injectées dans le cerveau, ces cellules sont capables de se différencier en cellules nerveuses. La transduction de cellules souches mésenchymateuses de patients MPSI-H avec un vecteur retroviral Idua permet de rétablir une activité enzymatique supérieure ou égale à la normale, *in vitro* (Baxter *et al.*, 2002).

Certaines limites sont apparues avec l'utilisation de vecteurs rétroviraux murins. Ils transduisent moins efficacement les cellules humaines que les cellules murines. De plus ils ont tendance à devenir inactifs *in vivo*. Les vecteurs lentiviraux pourraient donc être une alternative intéressante. Ils sont capables de transduire des cellules en division ou non et permettent une expression à long terme *in vivo*. L'efficacité de transfert de gène d'un vecteur lentiviral de 3^{ème} génération a été testée *in vitro* dans des fibroblastes de patients MPS I. Les cellules transduites présentaient une activité enzymatique 20 fois supérieure à la normale (Di Natale *et al.*, 2002). Cependant pour obtenir une activité enzymatique importante et une efficacité thérapeutique, une forte expression du transgène est requise. Cela sous entend la nécessité de multiples intégrations du vecteur dans les cellules ; ce qui augmente le risque d'une intégration à un endroit non approprié, délétère pour l'individu (Biffi and Naldini, 2005).

3.3.2 Utilisation de cellules encapsulées

Cette approche consiste à apporter la protéine thérapeutique par implantation de microcapsules contenant les cellules recombinantes. Celles-ci se retrouvent ainsi protégées du système immunitaire de l'hôte. Cette stratégie a permis le traitement de maladies de surcharge lysosomale, de l'hémophilie, du cancer dans des modèles murins. Les troubles neurologiques et comportementaux ont pu être améliorés chez des souris MPS VII grâce à l'implantation intra-ventriculaire de cellules recombinantes encapsulées (Ross *et al.*, 2000). L'utilisation de cellules encapsulées a ensuite été testée dans le modèle canin MPS 1 (Barsoum *et al.*, 2003).

Des cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) ont été génétiquement modifiées pour exprimer l' α -L-Iduronidase canine puis encapsulées dans des microcapsules d'alginate. Les microcapsules ont été injectées par voie intraventriculaire. Une activité enzymatique faible a été détectée dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien 21 jours après l'implantation. Des réactions inflammatoires étendues sont apparues au niveau du site d'implantation et à proximité des microcapsules.

Cette première étude a montré la faisabilité de la technique sur un modèle gros animaux. Cependant un certain nombre de mise au point sont nécessaires afin de montrer l'efficacité de cette technologie dans le SNC de l'homme. Il est nécessaire de développer des procédures neuro-chirurgicales moins invasives, de trouver des combinaisons microcapsule/cellules recombinantes biocompatibles, et d'augmenter la production de la protéine d'intérêt.

3.3.3 Transfert de gène *in vivo*

3.3.3.1 A l'aide de vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux de 3^{ème} génération ont permis un transfert de gène efficace et sans risque dans des fibroblastes MPS I *in vitro* (Di Natale *et al.*, 2002). Suite à ces résultats, le potentiel thérapeutique d'un vecteur lentiviral Idua a été évalué chez un modèle murin MPS I par injection intraveineuse (Di Domenico *et al.*, 2005). Une activité enzymatique Idua a été détectée 1 mois post-injection dans tous les organes, avec des concentrations plus élevées dans le foie et la rate (0,77% et 1% de l'activité normale respectivement) associée à une correction de la pathologie, par diminution de la concentration en GAG, dans le foie, la rate, les reins, le cœur et les poumons. Aucune amélioration neuropathologique n'a été démontrée chez ces souris. Les études de biodistribution montrent une intégration exclusive du vecteur dans le foie et la rate, suggérant que la présence d'enzyme et la correction de la pathologie observée dans les autres organes sont liées au phénomène de sécrétion-recapture. Des anticorps dirigé contre l'Idua ont été détectés à un mois post-injection, sans empêcher toutefois la correction de la maladie. Des études à long terme (6 mois) montrent que le vecteur lentiviral est toujours intégré dans le foie et la rate, mais à un niveau moindre. Aucune activité enzymatique n'est détectée cependant chez les souris à long terme, suggérant une

réponse immunitaire humorale forte contre le transgène associée à une réponse cellulaire avec perte des cellules transduites.

L'efficacité de transduction d'un vecteur lentiviral Idua, par injection intraveineuse, a été évaluée chez des souris MPS I nouveaux-nés et adultes (Kobayashi *et al.*, 2005). Les souris nouveaux-nés injectées présentent une activité enzymatique Idua dans de multiples organes. Cette activité correspondant à 20-25% de l'activité normale dans le foie et entraîne une réduction de l'accumulation des GAG dans les tissus. L'injection du vecteur lentiviral Idua améliore la survie des souris nouveaux-nés et prévient l'apparition des anomalies squelettiques. Les souris adultes injectées présentent des améliorations phénotypiques modérées de la maladie, alors que les lésions de surcharge sont totalement corrigées chez les souris nouveaux-nés injectées, y compris au niveau du système nerveux central. Cela s'explique par une perméabilité des barrières physiologiques pendant la période néonatale, favorisant le passage du vecteur notamment au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Le développement d'une tolérance immunologique suite au traitement durant la période néonatale est une autre explication possible pour les différences d'efficacité du traitement observées entre les adultes et les nouveaux-nés. De plus l'administration du vecteur pendant la période néonatale permet au traitement d'être actif avant que des dommages irréversibles n'aient eu lieu. L'injection intraveineuse chez la souris nouveau-né d'un vecteur rétroviral portant l'ADNc de l'Idua canine a également été évalué (Liu *et al.*, 2005c). De fortes doses (10^9 pi/kg) ont permis une correction biochimique et des lésions de surcharge dans tous les organes, y compris le SNC.

Ces premiers résultats *in vivo* confirment le potentiel thérapeutique et l'efficacité de transduction des vecteurs lentiviraux, tout en montrant la nécessité de contrôler les réponses immunitaires pour permettre une expression à long terme du transgène.

3.3.3.2 A l'aide de vecteurs recombinants dérivés de l'Adéno-associated virus

Les vecteurs AAVr transduisent efficacement le muscle (Xiao *et al.*, 1996), le foie (Snyder *et al.*, 1997a) et le cerveau *in vivo* (Klein *et al.*, 1998). Ils représentent donc une alternative intéressante aux vecteurs lentiviraux et rétroviraux dans le traitement des maladies de surcharge lysosomale. De plus diverses études ont montré qu'ils étaient capables de

transduire des cellules hématopoïétiques *in vitro* (Zhou *et al.*, 1994; Fairbairn *et al.*, 1996; Fisher-Adams *et al.*, 1996; Malik *et al.*, 1997; Ponnazhagan *et al.*, 1997).

L'efficacité de transduction d'un vecteur AAVr porteur du l'ADNc de l'Idua humaine a été testée dans différents types cellulaires (dans des cellules 293, des fibroblastes MPS I, et des cellules hépatiques humaines HuH7) afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des vecteurs AAVr dans le traitement des maladies de surcharge lysosomale (Hartung *et al.*, 1999). Une activité enzymatique élevée est détectée dans les 3 types cellulaires. Suite aux résultats concluants obtenus *in vitro*, l'efficacité du transfert de gène médié par l'AAV a été testée *in vivo* dans des modèles animaux MPS I. Ces animaux peuvent être injectés par voie systémique ou directement dans le tissu cible (principalement le SNC étant donné qu'aucun traitement efficace n'existe pour les atteintes neurologiques)

➤ Thérapie systémique :

L'objectif est d'obtenir une correction de la pathologie dans tous les organes suite à une injection intraveineuse. Des souris KO sont injectées à la naissance par voie intraveineuse avec un AAVr porteur de l'ADNc de l'Idua humaine. Elles présentent une diminution des GAG excrétés dans les urines, ainsi qu'une correction histopathologique du cœur, du foie et des poumons. Les malformations crânofaciales sont améliorées et les lésions de surcharge dans l'hippocampe. Ces résultats montrent qu'une injection néonatale d'AAV-Idua permet une amélioration des lésions des tissus périphériques mais également du système nerveux central. A la différence des nouveaux-nés d'animaux de grande taille, les nouveaux-nés murins présentent un plus grand nombre de cellules souches en division, une perméabilité des barrières physiologiques et un état immunologique plus naïf (Stewart and Hayakawa, 1987). Il est donc important de vérifier l'efficacité et la sécurité d'une injection systémique de l'AAV chez l'adulte avant d'initier des essais d'injections néonatale ou *in utero* chez des patients MPS I.

➤ Thérapie du SNC

L'AAV est un outil thérapeutique très intéressant pour les applications de transfert de gène dans le système nerveux central (§ Transfert de gènes dans le SNC à l'aide d'AAVr). Une expression à long terme du transgène a été démontrée dans de nombreux modèles animaux, et notamment chez le primate (Kaplitt *et al.*, 1994; Bankiewicz *et al.*, 2000). L'AAV transduit principalement les neurones (McCown *et al.*, 1996), et est non pathogène pour l'homme.

Pour essayer de traiter les affections neurologiques, différentes voies d'abord sont possibles : soit une injection intra-parenchymale, soit une injection intrathécale de l'AAV.

La restauration de l'activité enzymatique Idua a été mise en évidence dans la totalité du cerveau à la suite de l'injection d'un vecteur AAV-Idua dans le striatum de souris MP 1 (Desmaris *et al.*, 2004). Deux sérotypes d'AAV ont été évalués : l'AAV2 et l'AAV5. Avec le sérotype 5 l'activité enzymatique est plus élevée, et les régions corrigées sont plus étendues. Pour les 2 sérotypes, la concentration en gangliosides GM2 et GM3 a diminué jusqu'à la normale, les lésions de surcharge ont disparu dans les 2 hémisphères et régressé dans le cervelet.

RESULTATS

De plus en plus d'essais cliniques utilisant l'AAV ont vu le jour. L'AAV est un vecteur particulièrement attractif pour le transfert de gène dans le SNC. Il est non pathogène. Il peut transduire des cellules non mitotiques, et permet un transfert de gène stable à long terme. Il peut être produit facilement et à des titres élevés. Une utilisation de l'AAVr en clinique implique de bien caractériser les stocks d'AAVr produits, et donc d'améliorer les techniques de production et de purification. Des études précédentes ont montré une encapsidation aspécifique entraînant la contamination des préparations d'AAVr par des particules portant des séquences rep-cap ou des séquences plasmidiques, nous avons donc, dans une première étude, caractérisé les séquences non spécifiques encapsidées et leur devenir *in vivo*. Après avoir évalué la sécurité des lots d'AAVr produits, il est nécessaire d'étudier le potentiel thérapeutique des vecteurs AAV dans des modèles animaux.

La mucopolysaccharidose de type 1 est une maladie de surcharge lysosomale affectant de nombreux organes et tissus, et notamment le SNC dans sa forme la plus sévère. Les approches thérapeutiques existantes, enzymothérapie substitutive et greffe de moelle osseuse, ne permettent pas la correction des atteintes neurologiques en raison de l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique. La thérapie génique est aujourd'hui la seule méthode envisageable pour traiter les atteintes neurologiques. Ceci peut se faire soit en transplantant des cellules génétiquement modifiées soit en injectant un vecteur directement dans le cerveau. Ces 2 méthodes ont montré une surexpression et une sécrétion de l'enzyme lysosomale dans le cerveau. Cependant, la thérapie *ex vivo* ne permet qu'une expression transitoire de l'enzyme et une faible diffusion de celle-ci dans le parenchyme à partir de la greffe. Hors dans ces maladies, les lésions cérébrales sont diffuses dans tout le cerveau et touchent tous les types cellulaires. L'injection intracérébrale d'un vecteur AAVr dans un modèle murin MPS1 ayant montré son potentiel thérapeutique, nous nous sommes intéressés au transfert de gène médié par un vecteur AAV5 dans le SNC d'un modèle canin de mucopolysaccharidose de type 1.

Douze sérotypes d'AAV ont été décrits jusqu'à ce jour. Dans l'objectif de futures applications cliniques chez l'homme utilisant des vecteurs AAVr, nous avons voulu déterminer le sérotype d'AAV permettant le transfert de gène le plus efficace après une

injection intracérébrale chez le primate. Nous avons restreint notre étude aux 3 sérotypes les plus décrits dans la littérature en transfert de gène dans le SNC de rongeurs, à savoir l'AAV1, l'AAV2 et l'AAV5. Nous avons comparé leur profil de transduction dans le SNC et établi leur biodistribution dans le SNP, les organes à distance et les fluides biologiques.

Premier article

Evidence for Encapsidation of Prokaryotic Sequences during Recombinant Adeno-Associated Virus Production and Their in Vivo Persistence after Vector Delivery

Gilliane Chadeuf, Carine Ciron, Philippe Moullier, and Anna Salvetti. 2005, *Molecular Therapy*, 12(4): 744-753

Evidence for Encapsidation of Prokaryotic Sequences during Recombinant Adeno-Associated Virus Production and Their *in Vivo* Persistence after Vector Delivery

Gilliane Chadeuf,¹ Carine Ciron,¹ Philippe Moullier,^{1,2} and Anna Salvetti^{1,*}

¹INSERM U649, 44035 Nantes, France

²Etablissement Français du Sang des Pays de Loire, 44011 Nantes, France

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed at INSERM U649, Bâtiment Jean Monnet, 30 Boulevard Jean Monnet, CHU Hôtel-Dieu, 44035 Nantes Cedex 01, France. Fax: +33 2 40 08 74 91. E-mail address: anna.salvetti@univ-nantes.fr.

Available online 14 July 2005

Recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) have been successfully used for long-term gene expression in animal models and in patients. However, while the therapeutic potential of rAAV appears promising, safety issues, including contaminants found in vector stocks, must be further evaluated. We previously reported that a *cis*-acting replication element present within the AAV-2 p5 promoter was responsible for the encapsidation of *rep-cap* sequences observed during rAAV production. In that study, we also noticed that plasmid-derived prokaryotic sequences (such as the ampicillin resistance gene) could be found packaged into AAV capsids. In this report, first we confirmed and extended the latter observation by analyzing rAAV stocks produced using different procedures. Second, we demonstrated that these plasmid-derived sequences were transferred and persisted *in vivo* after rAAV injection into different tissues. Third, our data showed that at least some of these packaged plasmid molecules were linked to the AAV ITRs and were present *in vivo* in a form that could be rescued through bacterial transformation. This study highlights the need for more stringent characterization of rAAV stocks and provides useful information on the development of rAAV production methods that are able to circumvent or limit the generation of such undesirable particles.

Key Words: adeno-associated virus, DNA packaging, gene transfer

INTRODUCTION

Adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is a defective and nonpathogenic parvovirus with a 4.7-kb single-stranded DNA genome. Efficient replication requires co-infection with adeno- or herpesvirus, which provide helper functions. The AAV-2 genome consists of two open reading frames, encoding regulatory (Rep) and structural (Cap) proteins, flanked by 145-bp inverted terminal repeats (ITRs) [1,2]. The ITRs are the *cis*-acting elements required for virus replication and packaging. Therefore, recombinant AAV-2 vectors (rAAV), in which the *rep-cap* genome is replaced by an expression cassette encoding the transgene, can be efficiently produced when Rep and Cap are provided *in trans* by a *rep-cap*-expressing plasmid [3,4]. Generation of rAAV stocks requires transfection of the vector and of the *rep-cap* constructs into cells such as 293 cells that are either infected with adenovirus or cotransfected with an

adenovirus helper plasmid [5,6]. An alternative method relies on adenovirus or herpesvirus infection of packaging cell lines that stably harbor AAV *rep-cap* genes and/or rAAV vector DNA [7–11].

The characterization of the rAAV stocks indicated that, despite the lack of homologous sequences between the *rep-cap* and the vector constructs, *rep-cap* sequences were present in 0.1 to 1% of the particles [12–14]. We have reported that a 350-bp sequence embedded in the p5 promoter of the AAV-2 *rep* gene contains a *cis*-acting replication element responsible for the Rep-dependent replication and packaging into AAV-2 capsids of a transiently transfected *rep-cap* sequence [15,16]. Surprisingly, in the same study, we found evidence that encapsidated DNA also hybridized to a plasmid backbone probe, indicating that prokaryotic sequences, such as the ampicillin resistance (*amp^R*) gene, were similarly packaged during generation of

rAAV-2 particles [15]. This observation was indirectly supported by Miller *et al.*, who found integrated pBR322 sequences following *in vitro* infection of HeLa cells with rAAV particles [17].

In the present study, first we confirmed and extended this observation by quantifying the plasmid-containing particles present in rAAV stocks and by analyzing the origin of such sequences. Second, we showed that these sequences were transferred and persisted *in vivo* after rAAV injection in different tissues. Third, we demonstrated that at least part of these plasmid molecules are linked to the AAV ITR and were present *in vivo* in a form that can be rescued through bacterial transformation. In conclusion, this study highlights the need for more stringent characterization of rAAV stocks and also provides useful information on the development of rAAV production methods that are able to circumvent or limit the generation of such undesirable particles.

RESULTS AND DISCUSSION

Universal Packaging of Plasmid Backbone Sequences during rAAV Production by Transient Transfection

We quantified the presence of particles containing plasmid-derived sequences in rAAV-2 stocks obtained using common procedures. In general, the production of rAAV particles relies on the cotransfection of several plasmids (Fig. 1) the rAAV vector (such as pAAVLZ), the *rep-cap* packaging sequences, and the adenovirus helper plasmids (such as pRC and pXX6, respectively). The last two can be combined in one single plasmid (pDG). Alternatively, since transfection is accomplished using 293 cells, the helper functions can also be supplied by an E1-deleted adenovirus (Ad.dl324). Therefore, we evaluated three different configurations in which the vector plasmid

remained unchanged while the packaging and adenovirus helper functions varied (Table 1). We conducted a small-scale production and purified rAAV-2 particles by two consecutive CsCl gradients. Importantly, the virus was recovered from fractions having a density corresponding to mature AAV particles (1.38 to 1.41 g/ml). In addition, we extracted packaged DNA after extensive treatment of the particles with benzonase, under conditions that have been previously shown to lead to a complete degradation of any contaminating DNA present outside the particles [15]. The results indicated that the *amp^R* sequence was found packaged under all three conditions and represented 1 to $\approx$ 6% of the total vector genomes (Table 1). We found similar ratios by dot-blot analysis of the same stocks (data not shown). In contrast, we found *rep-cap* sequences packaged at levels that were much lower, ranging from 0.3 to 1.2% of the vector genomes (data not shown). To test for the possibility that the rAAV vector plasmid was solely responsible for this observation, we similarly analyzed wild-type AAV-2 particles produced by transient transfection using either pXX6 or Ad.dl324 to supply helper functions. Under both conditions, we detected *amp^R*-containing particles at levels similar to those found using a rAAV plasmid (Table 1).

In the above experiments, all the plasmids used for rAAV production carried the *amp^R* gene. To determine further the origin of the packaged plasmid backbone sequences, we then used another vector plasmid, pAAVGFP(K), that contains the *kan^R* in place of the *amp^R* gene in the plasmid backbone (Fig. 1). We cotransfected the pAAVGFP(K) plasmid into 293 cells with the *amp^R*-containing pDG plasmid and analyzed the rAAV-2 stock by quantitative real time PCR (Q-PCR) or dot-blot searching for both the *kan^R* and the *amp^R* genes (Table 1). We found that both sequences were packaged into

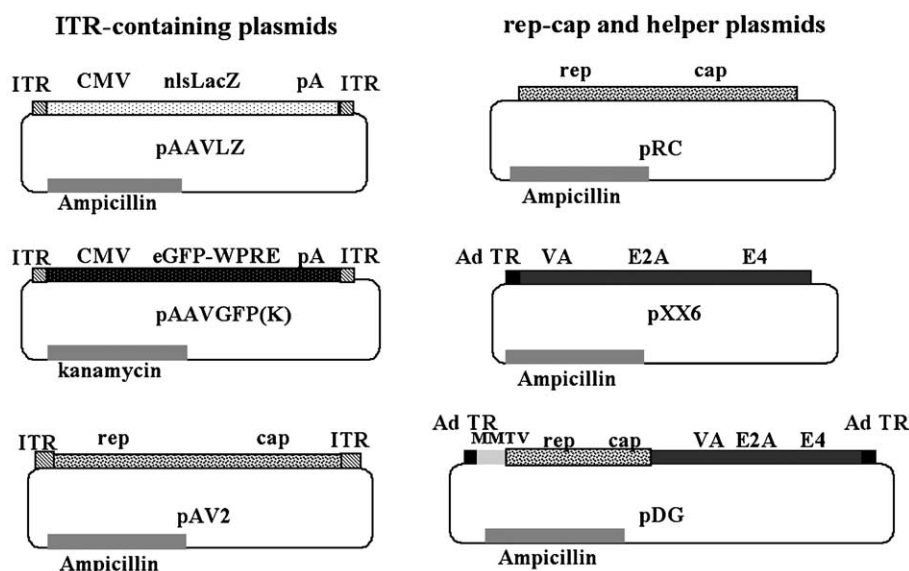


FIG. 1. Structure of the plasmids used for rAAV production. See Materials and Methods for details.

TABLE 1: Quantification by Q-PCR of AAV particles containing vector and plasmid-derived sequences

AAV plasmid	<i>rep-cap</i> plasmid	Helper	AAV (vg/ml)	amp ^R (ag/ml)	kan ^R (kg/ml)
pAAVLZ	pDG	pDG	2.0×10^{10}	1.2×10^9 (6.1%)	ND
pAAVLZ	pRC	pXX6	3.8×10^{10}	1.8×10^9 (4.8%)	ND
pAAVLZ	pRC	Ad.dl324	4.6×10^{10}	5.8×10^8 (1.3%)	ND
pAV2	–	pXX6	2.5×10^{10}	5.5×10^8 (2.2%)	ND
pAV2	–	Ad.dl324	3.7×10^{10}	1.9×10^8 (0.5%)	ND
pAAVGFP(K)	pDG	pDG	3.8×10^{10}	1.8×10^8 (0.5%)	1.5×10^9 (3.9%)

AAV-2 particles produced using the indicated plasmids were purified on two consecutive CsCl gradients and packaged DNA was quantified by Q-PCR using primers recognizing either AAV (rAAV or wt AAV) or plasmid backbone (amp^R gene) sequences. The numbers in parentheses indicate the percentage of amp^R over rAAV or AAV-2 genomes. vg/ml, vector genomes/ml; ag/ml, amp^R genomes/ml; kg/ml, kan^R genomes/ml. ND, not detected.

AAV particles, indicating that plasmid backbone sequences present in the rAAV stocks originated from both the rAAV vector plasmid and the helper plasmid. Nevertheless, the higher ratio of kan^R versus amp^R genomes strongly suggested that the vector plasmid was the major source of contaminating backbone-derived sequences.

This latter result implied indirectly that these plasmid molecules had been able to replicate and to be packaged. The prevalent model to explain AAV replication from a circular plasmid implies that the AAV genome is rescued from the plasmid either before or during replication, thus preventing the concomitant replication of the plasmid backbone [18–21]. Our results suggested that if rescue and preferential replication of the rAAV vector can occur, replication of the entire rAAV plasmid is also taking place at a significant level. Accordingly, replication of backbone sequences was previously observed during *in vitro* replication of AAV-containing plasmids [22,23]. That the pDG plasmid, which has an almost complete deletion of the p5 promoter, was relatively poorly encapsidated, compared to the ITR-containing vector plasmid (Table 1), supports a relationship between replication efficiency and the level of plasmid backbone sequence encapsidation in AAV-2 particles.

Packaging of Prokaryotic DNA Sequences Also Occurs during Production of rAAV Using Stable Producer Cell Lines

The previous results indicated that prokaryotic sequences were packaged when rAAV was produced by transient transfection. However, it could be expected that such undesirable events would not take place during the production of rAAV particles using stable producer cell lines. The stable cell lines used for these experiments were derived from HeLa cells and contained the *rep-cap* gene and a rAAV vector (AAVLZ) integrated in the cell genome [7,10,24]. All of these producer cell clones assembled rAAV particles upon infection with wild-type adenovirus (wild-type Ad5) (Table 2). In addition, we detected amp^R sequences at a ratio varying between 3 and 7% of the total number of vector genomes. Importantly, we found no amp^R sequences by PCR in the wild-type Ad5 stock used in all of these experiments (data not shown).

The result obtained with the 26Z9 cell clone, in which the *rep-cap* genes were transferred by plasmid transfection, whereas the vector was introduced by infection with purified rAAVLZ particles, suggested that integration of the *rep-cap* plasmid in the original packaging cell clone was sufficient to generate amp^R-containing particles. To confirm this hypothesis, we analyzed the AAV particles produced by a similar packaging cell clone (HeRC32) that was used to generate the two HeAAVLZ clones [7]. The HeRC32 cells contained approximately two to three copies of the entire *rep-cap* plasmid integrated in the cell genome in a head-to-tail configuration (data not shown). As shown in Table 2, infection of HeRC32 cells with wild-type Ad5, in the absence of the vector plasmid, was sufficient to generate a low but detectable level of amp^R-containing particles. These results indicated that amp^R sequences could also be packaged using stable producer cell clones generated by stable transfection of a *rep-cap* plasmid. We have previously described that the integrated *rep-cap* genome in the HeRC32 cell line was subjected to ≈ 100 -fold amplification upon infection of the cells with wild-type Ad5 [25]. This phenomenon was shown to generate large extrachromosomal *rep-cap* molecules. We similarly observed that in HeRC32 cells, the prokaryotic backbone plasmid sequence was also subjected to an intense

TABLE 2: Quantification by Q-PCR of AAV particles containing vector and plasmid-derived sequences produced from stable cell clones

Cell clone	AAV vector ^a	Helper virus	rAAV (vg/ml)	amp ^R (ag/ml)
AAVLZ118	pAAVLZ	wt Ad5	1.9×10^{10}	1.2×10^9 (6.3%)
AAVLZ149	pAAVLZ	wt Ad5	3.2×10^{10}	1.2×10^9 (3.7%)
26Z9	rAAVLZ	wt Ad5	1.0×10^{10}	2.8×10^8 (2.7%)
HeRC32	–	wt Ad5	–	1.08×10^8

AAV particles produced by infecting each stable cell clone with wild-type (wt) Ad5 were purified and quantified as indicated in the footnote to Table 1. The numbers in parentheses indicate the percentage of amp^R over vector genomes.

^a This column indicates whether AAV vector integration into each stable cell clone was obtained by transfection with a rAAV plasmid (pAAVLZ) or infection with a rAAV (rAAVLZ).

amplification upon adenovirus infection (data not shown). As such, these data suggested that the packaging of such plasmid-derived sequences was dependent upon their amplification induced by adenovirus infection.

Globally, these data and those presented in the previous paragraph indicated that such undesirable particles are generated by both production methods. It remains to be determined if nonvector sequences are also packaged using other production methods like those employing baculoviruses or herpesviruses [11,26–28]. In addition, three alternatives can be considered to prevent the formation of such particles. The first is the modification of the prokaryotic plasmid backbone of the vector plasmid by increasing its size and/or by removing the nonspecific Rep-binding site (RBS) sequences that are present in almost all pBR322-derived plasmids [29]. Indeed, the presence of such sequence could favor replication and packaging of prokaryotic backbones. The second alternative would be establishing packaging cell clones with no integrated backbone sequences. Finally, the third and certainly most efficient procedure would consist in the sequential amplification of the rAAV particles from an initial stock produced by plasmid transfection. So far, attempts to amplify the rAAV particles on stable *rep-cap* cell clones using adenovirus as a helper have proved unsuccessful (A. Salvetti, unpublished results) but a recent report indicated that it could be feasible using a recombinant pseudorabies virus containing the *rep* and *cap* genes [27].

The amp^R Sequence Is Found in Genetically Modified Tissues After rAAV-Mediated Gene Transfer

We next asked whether the prokaryotic sequences found packaged into AAV particles could also be detected *in vivo* after rAAV injection. To answer this question, we retrospectively analyzed the tissues from animals used in previous gene transfer studies. This decision was motivated by (i) the availability of several tissues from non-human primates and dogs that would make this analysis particularly pertinent, (ii) the use in those studies of different transgenes and alternative AAV serotypes that are more relevant for clinical applications, and (iii) the availability of tissues from animals injected with rAAV produced either by transient transfection or by stable producer cell clones.

For all these samples, we first measured the presence of amp^R and vector, i.e., transgene, sequences by non-quantitative PCR after extraction of total genomic DNA (Fig. 2, left). We first analyzed the muscles of two macaques that were injected intramuscularly with a rAAV-2 vector encoding the macaque erythropoietin cDNA (AAVEpo) under the control of a tet-regulated promoter [30]. The analysis of total DNA extracted from muscle biopsies, 1 and 5 months after rAAV injection, indicated that vector and amp^R sequences could be easily detected by PCR in both animals, whereas they were

undetectable in the tissue from a mock-injected animal (Fig. 2A). We next analyzed the brain tissue from a macaque and a dog that were injected intracerebrally with a suspension of rAAV-5 particles. In these experiments the rAAV-5 preparation was obtained by cotransfection of a rAAV-5 vector with the AAV-5 *rep-cap*-expressing construct pAAV5-2 and using plasmid pXX6 to supply the helper functions [6,31]. The vector encoding the human α -L-iduronidase (AAVIDUA) was injected into the putamen of a normal macaque and a mucopolysaccharidosis type I-affected dog (8×10^{10} vector genomes in 80 μl) (J. M. Heard and P. Moullier, unpublished data). Either 5 months (macaque) or 1 month (dog) after rAAV injection, we extracted total DNA from coronal slices surrounding the injection track and analyzed it by PCR to detect transgene and amp^R sequences. In both animals, IDUA and amp^R sequences could be amplified in the slices that were closer to the injection site, whereas more distant sites were negative (Figs. 2C and 2E).

Finally, we looked for the presence of the amp^R sequence *in vivo* after injection of rAAV particles produced using the stable cell clones. For these analyses, we used total DNA extracted from the brain of three mice deficient for the adrenoleukodystrophy protein (ALDP) that had received a preparation of a rAAV-2 encoding the human ALDP (AAVALD), which was injected into the corpus callosum. The vector used in these studies was produced using a stable AAVALD cell line infected with wild-type Ad5 [10]. As shown in Fig. 2G, we found ALD and amp^R sequences in the brains of the three mice analyzed, 6 weeks after rAAV injection. This finding confirmed that, as observed for rAAV stocks produced by transfection, the amp^R sequence packaged by the stable producer cell lines persisted *in vivo* following rAAV injection.

To substantiate these results further we measured the level of plasmid copies, i.e., amp^R , and transgene copies in these samples by Q-PCR and, when possible, compared these values with those measured in the original rAAV stock. The results of these analyses are shown in Fig. 2 (right) and summarized in Table 3. Importantly, we verified that the sensitivity of the Q-PCR was the same using either the amp^R primers or those hybridizing to the transgenes used and extended, in the linear and quantitative part of the assay, from 1 to 10^6 copies of plasmid. Also the sensitivity of this assay was not affected whether DNA was extracted from rAAV particles or from animal tissues (data not shown). The analyses conducted on the original rAAV stocks confirmed that, as previously demonstrated (Table 1), the level of amp^R genomes ranged from 1 to 5% of the total number of vector genomes (Table 3). Surprisingly the percentage of amp^R copies measured *in vivo* was consistently higher than that measured in the original rAAV stock, even though a great variability was observed among the samples. We do not

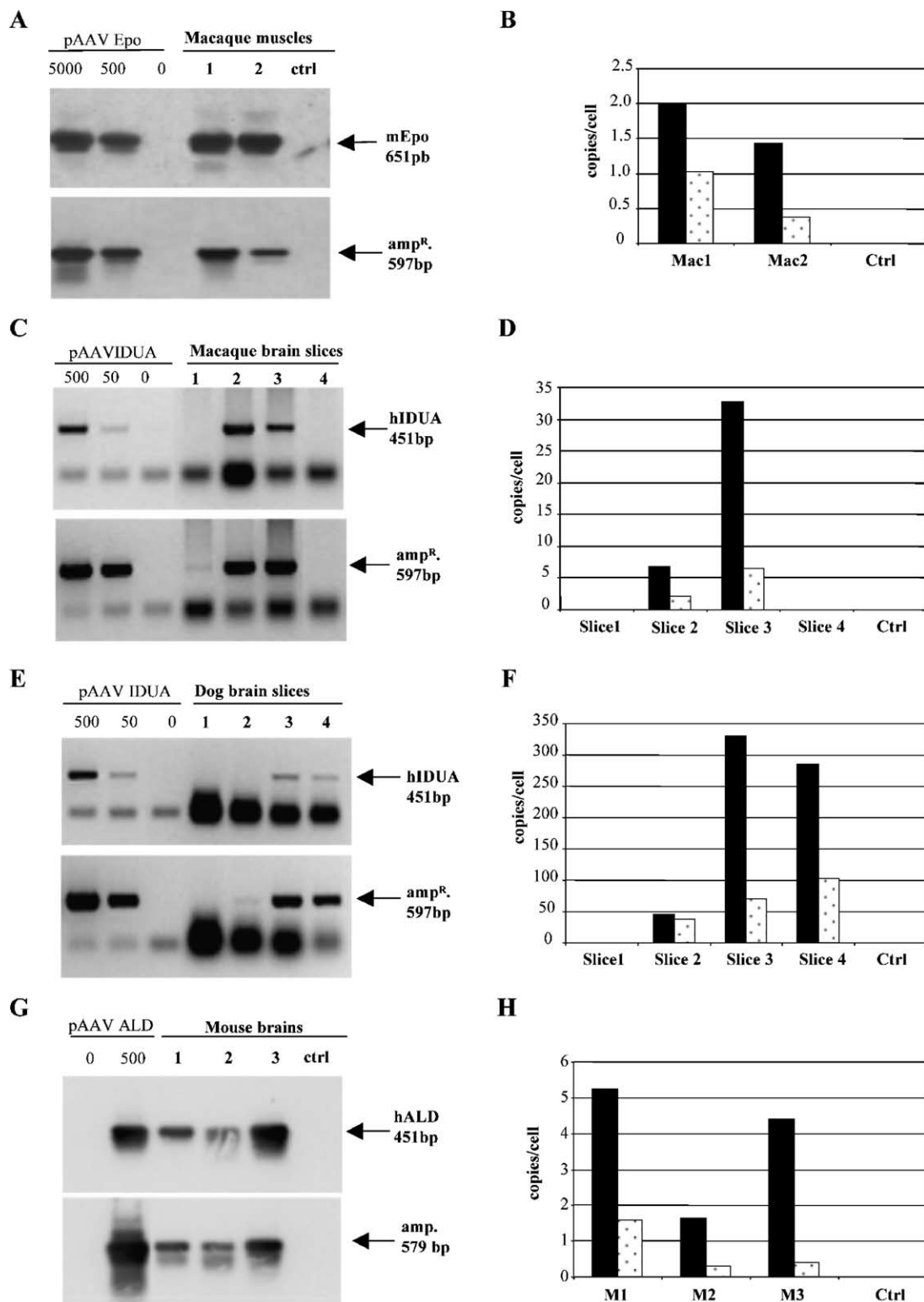


TABLE 3: Summary of the percentage of amp^R versus vector copies found *in vivo* and in the corresponding rAAV stock

rAAV	rAAV prep amp ^R /vector copies	Animal/time postinjection	Injected tissue	<i>In vivo</i> amp ^R /vector copies
AAVEpo 2/2	NA	Macaque/5 months	Muscle	50%
AAVEpo 2/1	1.3%	Macaque/1 month	Muscle	28%
AAVIDUA 5/5	1.4%	Macaque/5 months	Brain	S2, 31%; S3, 19%
AAVIDUA 5/5	1.4%	Dog/1 month	Brain	S2, 80%; S3, 21%; S4, 36%
AAVIDUA 5/5#	1.4%	Dog/3 months	Brain	S1, 5.2%
AAVALD 2/2*	4.1%	Mice/1.5 months	Brain	29%
AAVALD 2/2*	4.1%	Mice/1.5 months	Brain	19%
AAVALD 2/2*	4.1%	Mice/1.5 months	Brain	9%

The numbers following the name of the vector refer to the serotype of vector and the capsid. The amount of amp^R and vector copies was quantified *in vitro* and *in vivo* by Q-PCR as previously described and reported as the percentage of amp^R copies over the total number of vector copies. The analyses on dog and macaque brains were conducted on individual coronal slices (S). The asterisks designate the rAAV stocks produced using stable producer cell lines [10]. All these samples are also presented in Fig. 2, except for the one marked with #. NA, sample not available.

yet have an explanation for this result but it clearly indicates that these plasmid sequences were at least as stable as the transgene.

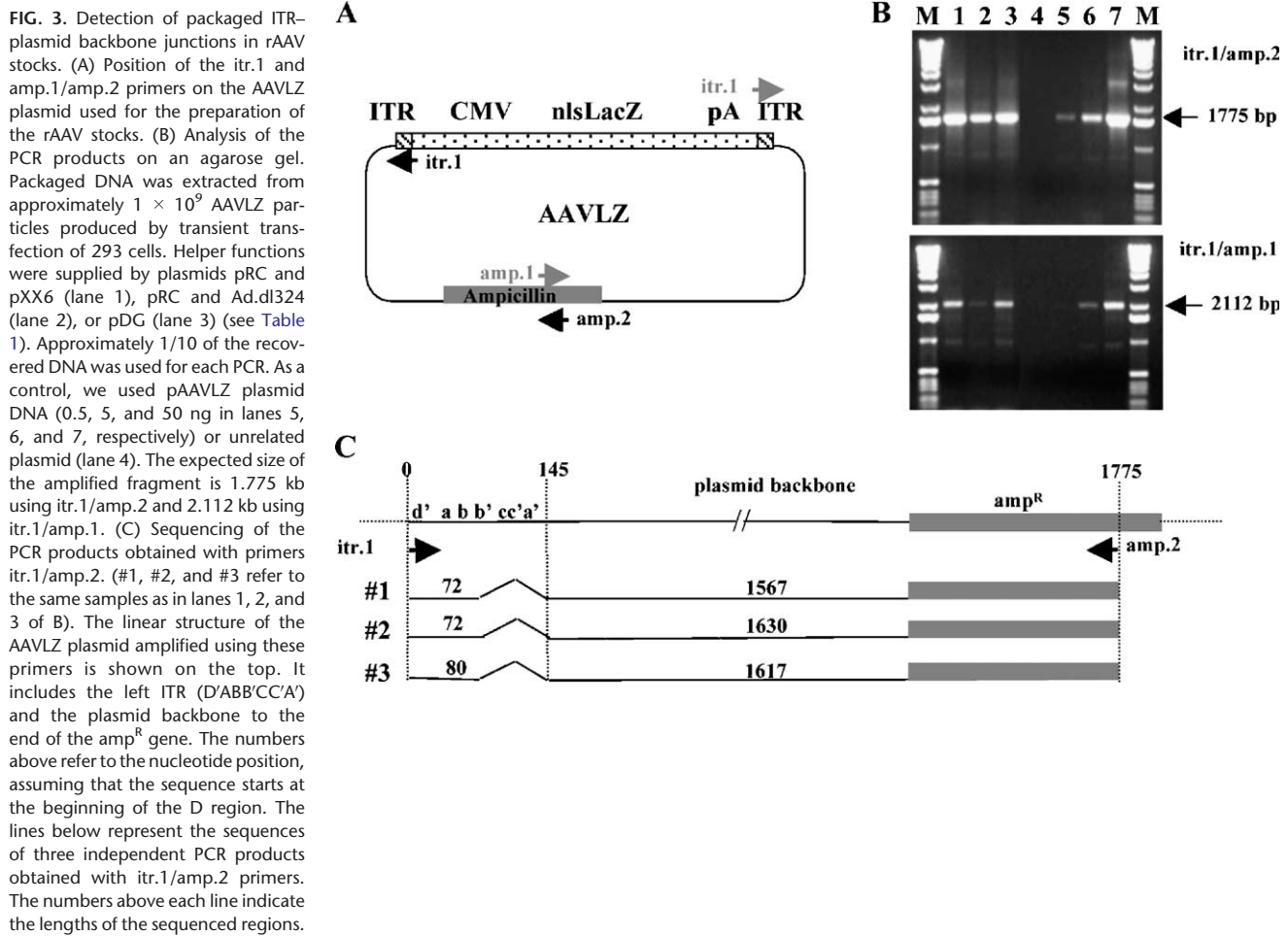
Detection of ITR–Plasmid Junctions Packaged into AAV Capsids and *in Vivo*

Previous models for rAAV replication from circular plasmids have proposed that the rescue of the rAAV genome occurs by the preferential replication of the sequences flanked by the viral ITRs, i.e., the rAAV vector [18–21]. In this study, the presence of prokaryotic sequences in rAAV stocks implied indirectly that they had been able to replicate, presumably because of the presence of the ITRs on the same plasmid. Consequently, we first asked whether the packaged molecules containing the amp^R sequence also contained the AAV ITRs. For this, we extracted DNA from three different rAAVLZ stocks and amplified it using a first primer in the ITR D region and a second one located in the amp^R gene (Fig. 3A). The analysis of the PCR products indicated that they had a size corresponding to the expected ITR–amp^R fragments (Fig. 3B). The sequencing of these PCR products confirmed the presence of plasmid sequences linked to the AAV ITR (Fig. 3C). However, in all the sequenced products it was not possible to detect the complete ITR and a gap was consistently observed between the B/B' region and the beginning of the plasmid backbone sequences. The same analysis conducted on seven other rAAV stocks pro-

duced with vectors containing different transgenes confirmed the presence of ITR–plasmid sequences with similar extensive deletions in the ITRs (Supplemental Fig. 1). The presence of this deletion in all the clones analyzed strongly suggested that it reflected the real structure of these packaged sequences even though it cannot be excluded that it was introduced during PCR amplification and/or sequencing.

Second, we asked if ITR–plasmid junctions were also found *in vivo* in a form that could be rescued through bacterial transformation. For this, *Escherichia coli* cells (DH5α) were transformed with 100 to 500 ng of DNA extracted from the rAAV-injected tissue and then selected on ampicillin-containing plates. The samples used in this assay were those derived from most of the animals presented in Fig. 2 and Table 3 (*n* = 5). We obtained a single amp^R colony reproducibly (*n* = 4) only with DNA from the AAVIDUA 5/5-injected dog brain that contained the highest number of vector amp^R sequences as detected by Q-PCR (Fig. 2F). Importantly, we obtained no colonies using DNA from uninjected animals. The restriction patterns of these four colonies suggested that they were identical and contained extensive deletions between the two viral ITRs in the transgene portion (data not shown). We determined the complete sequence of one rescued plasmid and confirmed that it derived from the parental pAAVIDUA construct. This rearranged plasmid contained the complete plasmid backbone of pAAVIDUA and had an extensive deletion in the transgene expression cassette

FIG. 2. Detection and quantification of transgene and amp^R sequences *in vivo* after rAAV injection. Total DNA was extracted from the following tissues: (A and B) Skeletal muscles from macaques 5 months and 1 month, respectively, after intramuscular injection of rAAV-2 encoding the mEpo. The same vector was packaged in either AAV-2 (rAAVEpo 2/2 for Mac1) or AAV-1 capsids (rAAVEpo 2/1 for Mac2) [30]. (C and D) Brain coronal slices of a macaque, 5 months after injection of rAAV-5 vector encoding the IDUA and packaged into AAV-5 capsids (rAAVIDUA 5/5). (E and F) Brain coronal slices of a dog, 1 month after injection of rAAVIDUA 5/5. (G and H) Brain slices of ALD^{−/−} mice, 1.5 months after injection into the corpus callosum of rAAV-2 particles encoding the ALDP (rAAVALD 2/2) [10]. In this last case the rAAVALD stock was produced using a stable cell clone [10]. The presence of transgene and amp^R sequences was evaluated by PCR (A, C, E, and G), followed by Southern blot analysis using appropriate probes (A and G). The same samples were analyzed by Q-PCR (B, D, F, and H): black columns, number of transgene copies per cell; dotted columns, number of amp^R copies per cell.



and in both AAV-5 ITRs (Fig. 4A). In both rearranged ITRs, the conserved sequence was in the A region and covered the RBS (Fig. 4B). Only the right ITR also conserved, in addition to A, a partial C and a complete D region including the terminal resolution site.

In conclusion, these results indicated that DNA molecules containing ITR–plasmid junctions could be isolated both from the rAAV stock and *in vivo* from a rAAV-transduced tissue. In both situations, an extensive deletion of the AAV ITR was observed with the preferential retention of the A region containing the RBS.

The main question raised by these studies is: Does the presence of these particles in the rAAV stocks actually represent a safety issue? On the one hand it could be argued that the findings reported in this study do not implicate any problem in terms of safety given that several long-term studies conducted in small and large animals have not revealed any problem associated with rAAV gene transfer. Also, the finding that, *in vivo*, most of the rAAV sequences are found in an episomal form is a strong

argument supporting the safety of these vectors [32–34]. On the other hand, our *in vivo* data indicated that plasmid sequences and in particular the antibiotic resistance gene are stable and present in the tissue in a potentially rescuable form. The finding that plasmid sequences could be rescued from only one sample, containing the highest amount of vector and plasmid DNA, certainly indicates that this event is not taking place at a high frequency. Nevertheless, this observation may become particularly relevant if one considers that much higher levels of transduction can now be achieved using new AAV serotypes [35]. The use of alternative antibiotic resistance genes, as already recommended by the Food and Drug Administration in the United States (www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf) and by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (CPMB/BWP/3088/99), can certainly reduce the potential risk associated with the transfer of such sequences *in vivo*. Nevertheless, the results from this study emphasize the need to quantify these undesirable particles in the rAAV stocks used for clinical

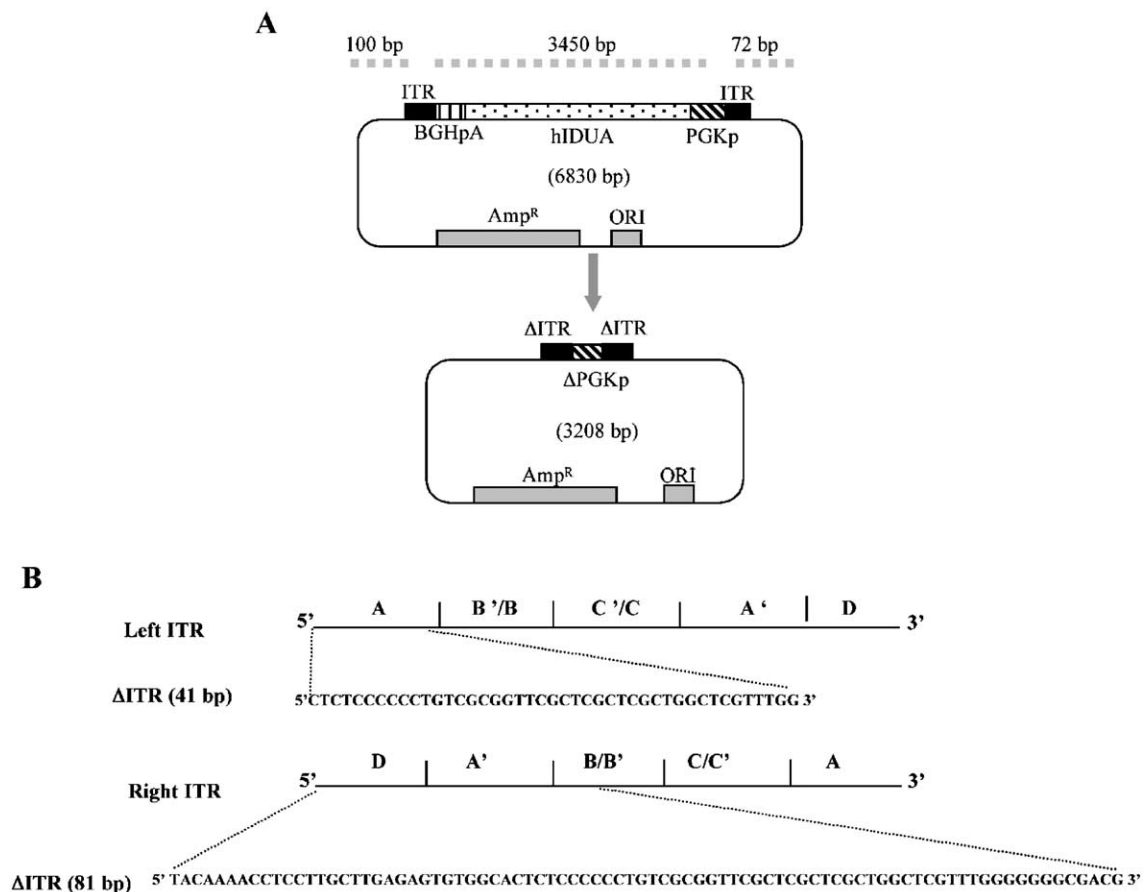


FIG. 4. Rescue and analysis of an amp^R plasmid from the rAAVIDUA 5/5-injected dog brain. *E. coli* cells (DH5α) were transformed with 100 to 500 ng of total DNA extracted from the coronal slice 3 of the dog brain injected with the rAAVIDUA 5/5 vector (Figs. 2E and 2F) and selected on ampicillin-containing plates. One amp^R colony obtained using this DNA sample was sequenced. (A) The top shows the structure of the parental pAAV-5IDUA plasmid that was used to make the rAAV stock. The bottom shows the structure of the rescued plasmid. The deletions observed in this plasmid are indicated by a gray dotted line above the parental pAAV-5 IDUA construct. BGHpA, bovine growth hormone polyadenylation signal; hIDUA, human α-L-iduronidase cDNA; PGKp, phosphoglycerate kinase-1-promoter; Amp^R, ampicillin resistance gene; ORI, prokaryotic origin of replication; ITR, AAV-5 inverted terminal repeats. (B) Structure of the wild-type and of the rearranged AAV-5 ITRs.

applications and to monitor the presence of these sequences *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines, Plasmids, and Viruses

HeLa and 293 cells were obtained from the ATCC. The packaging cell line HeRC32 was clonally derived from HeLa cells and contained two copies of the ITR-deleted *rep-cap* genome of AAV-2 [7]. The HeAAVLZ118 and HeAAVLZ149 producer cell clones were obtained after cotransfection of HeRC32 cells with both a rAAV vector plasmid encoding the nuclear-targeted β-galactosidase (AAVLZ) and the pSV-Hygro plasmid conferring resistance to hygromycin [10]. The 26Z9 cell line (kindly provided by Richard Snyder, Powell Gene Therapy Center, University of Florida, Gainesville) was obtained by infecting a packaging cell line with rAAVLZ particles [24]. All cell lines were maintained in DMEM (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Sigma) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, 5000 U/ml).

Most plasmids used in this study have been described previously (Fig. 1). The pRC plasmid contains the ITR-deleted AAV-2 *rep-cap* genome (nt

190 to 4484 of wild-type AAV) inserted into the psp72 plasmid (Promega) [13]. Plasmid pDG had both the AAV *rep-cap* genes, in which the p5 promoter region of the *rep* gene was partially replaced with the MMTV promoter, and the adenovirus E2a, E4, and VA1 sequences [5]. Plasmid pXX6 contained a mini-adenovirus genome including the E2a, E4, and VA1 sequences [6]. Plasmid pAV2 had the intact wild-type AAV-2 genome cloned into pBR322 [36]. The AAV plasmid vectors pAAVLZ and pAAVGFP(K) were derived from plasmid psub201 by deleting the *rep-cap* region and replacing it with an expression cassette encoding either LZ or the green fluorescent protein (GFP), both under the control of the cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter. All plasmids had the bacterial ampicillin resistance gene except for the pAAVGFP(K), which instead had the kanamycin resistance gene. Plasmid pAAV5-2, used for the production of rAAV-5 particles, contained the AAV-5 ITR-deleted *rep-cap* genome [31].

Wild-type adenovirus type 5 and the E1-deleted Ad.dl324 were produced and titrated on 293 cells according to standard procedures [37]. Adenovirus stocks were routinely checked by PCR for the absence of the *rep* sequence [13].

Vector Production and Titration

The rAAV particles were produced by transient transfection of 293 cells and purified as previously described [13]. An additional method for the

generation of rAAV particles involved using the rAAV producer cell lines HeRC32LZ118, HeRC32LZ149, and 26Z9 infected with wild-type Ad5 at an m.o.i. of 50. The rAAV particles were extracted from cell lysates 48 h after transfection (or infection) and purified on a double CsCl gradient as previously described [13]. Recombinant AAV-containing fractions were titrated by Q-PCR and dot blot to measure the number of particles containing vector and amp^R genomes per milliliter (g/ml).

Detection of rAAV and Plasmid Sequences by PCR and Q-PCR

PCR on DNA extracted from purified rAAV particles. Analysis by PCR was performed on pure or 1/10- and 1/100-diluted samples using a Perkin-Elmer thermocycler (Gene Amp PCR System 9600) as previously described [15]. The PCRs were performed using the following primers sets: 5'-ATTATCGATGAGCGTGGTGG-3'/5'-TGTCTGCTTCATCAGCAGG-3' for lacZ, 5'-AAGTTCATCTGCACCACCG-3'/5'-TGTCTGCTGGTAGTGGTCG3' for gfp, 5'-CATCCATAGTTGCTGACTCC-3'/5'-AAGTCTGCTATGTGGCGC-3' for amp^R, 5'-ATATTCGGCAAGCAGGCATC-3'/5'-TGCTCGACGTTGTCACTGAA-3' for kan^R. To detect ITR-plasmid backbone junctions we used the following primers: itr.1, 5'-GGAACCCCTAGTGATGGAG-3', located in the AAV ITR D region, and either amp.1, 5'-GGTATTATCCCCGATTGAC-3', or amp.2, 5'-GTCAATACGGGATAATACC-3', both located at the same position on the amp^R gene. The ITR-amp^R PCR products were sequenced directly using the BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems).

Analysis by Q-PCR was performed using SYBR Green quantitative PCR. The C_t values were obtained from the amplification of serial dilutions of plasmid DNA containing the lacZ, gfp, kan^R, or amp^R genes and were, respectively, 32.3 to 5.4 × 10⁵ copies, 41.7 to 6.9 × 10⁵ copies, 41.7 to 6.9 × 10⁵ copies, and 32.3 to 5.4 × 10⁵ copies. AAV vector, amp^R, and kan^R sequences were simultaneously amplified from serial dilutions of DNA extracted from the viral particles. Copy numbers were calculated using the regression curve equations established with each corresponding plasmids. Also, negative controls were provided by plasmids containing either an unrelated transgene or a different antibiotic resistance gene. Primers used were 5'-GTGGTGGTTATGCCGATC-3'/5'-AACCACCGCACGATAGAG-3' for lacZ, 5'-TGCAGTGCTTCAGCCGC-3'/5'-ACGTAGCCTTCGGGCGATG-3' for gfp, 5'-CCTGCCGAGAAAGTATCC-3'/5'-ATGTTTCGCTTGGTGGTC-3' for kan^R, 5'-TGAAGCCATACCAACGAC-3'/5'-AACTTTATCCGCCTC-CATC-3' for amp^R. Amplification parameters were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, using a Model 7700 sequence detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

PCR on DNA extracted from animal tissues. Total DNA from genetically modified tissues was extracted using an 8 M urea/1% SDS/10 mM EDTA/300 mM NaCl buffer containing 500 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim) and further processed as described [30]. The following primers were used: 5'-GAGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG-3'/5'-GTGTCAGCAGT-GATGGTTCGGAG-3' for the CMV-erythropoietin cassette (CMV-Epo), 5'-CATCCATAGTTGCTGACTCC-3'/5'-AAGTCTGCTATGTGGCGC-3' for amp^R, 5'-GCTACCTTCGTCAACAGTGC-3'/5'-CATAGAAGGCGATCTCCTCC-3' for human adrenoleukodystrophy (ALD), 5'-CTTCGAGACGTGGAATGAGC-3'/5'-GATGACCTTACCACCATGG-3' for human α-L-iduronidase (IDUA).

For Q-PCR, C_t values were obtained from the amplification of serial dilutions of plasmid DNA containing the hIDUA, the hALD, the macaque erythropoietin (mEpo), the macaque chorionic gonadotropin (CG), the mouse CCR5, the canine β-glucuronidase (GUSB), or the amp^R cDNAs and were, respectively, 38 to 6 × 10⁵ copies, 42.6 to 7.1 × 10⁵ copies, 32.3 to 5.3 × 10⁵ copies, 50.1 to 8.5 × 10⁵ copies, 43.6 to 6.9 × 10⁵ copies, 33.9 to 5.4 × 10⁵ copies, and 32.3 to 5.4 × 10⁵ copies. The AAV vector and amp^R were amplified from serial dilutions of total DNA extracted from the tissues. The mouse CCR5, the GUSB, the mEpo, and the macaque CG sequences were used as internal 2N genome standards for murine, canine, and macaque tissues, respectively. Primers used were 5'-ACTTGACCTTCTCAGGAGAAC-3'/5'-CACCTGCTTGTCTCAAAGTCA-3' for IDUA, 5'-TTCATCCAGGAGGGCGTACT-3'/5'-CAAAGGAAGGGCTACTCGGA-3' for ALD, 5'-GCTCCACTCCGAACCATCAC-3'/5'-TCATCTGTCCCTCTCTCTGC-3' for Epo, 5'-GCAGCACTTCTGACTGTGGG-3'/5'-

CGAGATGGACTTGGAGGGC-3' for CG, 5'-ACACCTGTTCCTGTAGGAA-3'/5'-TGTAGGGAGTCCAGAAGAGAAAGTAGAC-3' for CCR5, 5'-ACGCTGATTGCTCACACCAA-3'/5'-CCCCAGGTCTGCTTCATAGTTG-3' for GUSB, 5'-TGAAGCCATACCAACGAC-3'/5'-AACTTTATCCGCCTC-CATC-3' for amp^R. Amplification parameters were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and were conducted using a Model 7700 sequence detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Richard Snyder for providing the 26Z9 cell clone and John Chiorini for the AAVS-2 and AAVSLZ plasmids. We also thank Catherine Scoul and Mélanie Jeanneau (LEPA, UFR de Médecine, Nantes) for sequencing the PCR products. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies, Vaincre les Maladies Lysosomales, Association Nantaise de Thérapie Génique, Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire, and INSERM.

RECEIVED FOR PUBLICATION JANUARY 25, 2005; REVISED MAY 12, 2005; ACCEPTED JUNE 3, 2005.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.003.

REFERENCES

- Berns, K. I., and Giraud, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **218**: 1–23.
- Carter, B. J., Mendelson, E., and Trempe, J. P. (1990). AAV DNA replication, integration and genetics. In *Handbook of Parvoviruses* (P. Tijssen Ed.), Vol. 1, pp. 169–225. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Samulski, R. J., Chang, L. S., and Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* **63**: 3822–3828.
- Snyder, R., Xiao, S., and Samulski, R. J. (1996). Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In *Current Protocols in Human Genetics* (N. Dracopoli, et al., Eds.), Vol. 1, pp. 12.1.1–12.1.23 Wiley, New York.
- Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., and Kleinschmidt, J. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**: 2745–2760.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72**: 2224–2232.
- Chadeuf, G., et al. (2000). Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J. Gene Med.* **2**: 260–268.
- Clark, K. R., Voulgaropoulos, F., Fraley, D. M., and Johnson, P. R. (1995). Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* **6**: 1329–1341.
- Qiao, C., Wang, B., Zhu, X., Li, J., and Xiao, X. (2002). A novel gene expression control system and its use in stable, high titer 293 cell-based adeno-associated virus packaging cell lines. *J. Virol.* **76**: 13015–13027.
- Toublanc, E., et al. (2004). Identification of a replication-defective herpes simplex virus for recombinant adeno-associated virus type 2 (rAAV2) particle assembly using stable producer cell lines. *J. Gene Med.* **6**: 555–564.
- Conway, J. E., et al. (1999). High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I expressing AAV-2 rep and cap. *Gene Ther.* **6**: 986–993.
- Allen, J. M., Debelak, D. J., Reynolds, T. C., and Miller, A. D. (1997). Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by non homologous recombination during AAV vector production. *J. Virol.* **71**: 6816–6822.
- Salveti, A., et al. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* **9**: 695–706.
- Wang, X. S., et al. (1998). Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J. Virol.* **72**: 5472–5480.
- Nony, P., Chadeuf, G., Tessier, J., Moullier, P., and Salvetti, A. (2003). Evidence for packaging rep-cap sequences into AAV-2 capsids in the absence of the inverted terminal repeat: a model for the generation of rep+ AAV particles. *J. Virol.* **77**: 776–781.
- Nony, P., et al. (2001). Novel cis-acting replication element in the adeno-associated virus type 2 genome is involved in amplification of integrated rep-cap sequences. *J. Virol.* **75**: 9991–9994.

17. Miller, D., Rutledge, E., and Russell, D. (2002). Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat. Genet.* **30**: 147–148.
18. Gottlieb, J., and Muzyczka, N. (1988). In vitro excision of adeno-associated virus DNA from recombinant plasmids: isolation of an enzyme fraction from HeLa cells that cleaves DNA at poly(G) sequences. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2513–2522.
19. Samulski, R. J., Berns, K. I., Tam, M., and Muzyczka, N. (1982). Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2077–2081.
20. Samulski, R. J., Chang, L. S., and Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J. Virol.* **61**: 3096–3101.
21. Ward, P., and Berns, K. I. (1991). In vitro rescue of an integrated hybrid adeno-associated virus/simian virus 40 genome. *J. Mol. Biol.* **218**: 791–804.
22. Ward, P., Dean, F. B., O'Donnell, M. E., and Berns, K. I. (1998). Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol.* **72**: 420–427.
23. Ward, P., Urcelay, E., Kotin, R., Safer, B., and Berns, K. I. (1994). Adeno-associated virus DNA replication in vitro: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein. *J. Virol.* **68**: 6029–6037.
24. Mathews, L. C., Gray, J. T., Gallagher, M. R., and Snyder, R. O. (2002). Recombinant adeno-associated viral vector production using stable packaging and producer cell lines. *Methods Enzymol.* **346**: 393–413.
25. Tessier, J., et al. (2001). Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus rep–cap sequences. *J. Virol.* **75**: 375–383.
26. Feudner, E., de Alwis, M., Thrasher, A. J., Ali, R. R., and Fauser, S. (2001). Optimization of recombinant adeno-associated virus production using a herpes simplex virus amplicon system. *J. Virol. Methods* **96**: 97–105.
27. Shiau, A.-L., Liu, P.-S., and Wu, C.-L. (2005). Novel strategy for generation and titration of recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **79**: 193–201.
28. Urabe, M., Ding, C., and Kotin, R. M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* **13**: 1935–1943.
29. McCarty, D. M., et al. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* **68**: 4988–4997.
30. Chenuaud, P., et al. (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* **9**: 410–418.
31. Chiorini, J. A., Kim, F., Yang, L., and Kotin, R. M. (1999). Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J. Virol.* **73**: 1309–1319.
32. Duan, D., et al. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* **72**: 8568–8577.
33. Nakai, H., et al. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* **75**: 6969–6976.
34. Schnepf, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A., and Johnson, P. R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* **77**: 3495–3504.
35. Grimm, D., and Kay, M. A. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **3**: 281–304.
36. Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H., and Carter, B. J. (1983). Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* **23**: 65–73.
37. Graham, F. L., and Prevec, L. (1991). Manipulation of adenovirus vectors. In *Gene Transfer and Protocol* (E. J. Murray, Ed.), Vol. 7, pp. 109–128. Humana Press, Clifton, NJ.

1 Résultats et discussion du premier article :

1.1 Objectifs

La production des AAV recombinants consiste classiquement à transfecter le plasmide vecteur et le plasmide rep-cap dans des cellules 293. Les fonctions *helper* permettant la production d'AAVr sont ensuite apportées par infection avec un adénovirus ou par transfection avec un plasmide portant les fonctions adénovirales essentielles. La séquence rep-cap et les fonctions *helper* peuvent également être apportés par un même plasmide, comme le plasmide pDG. Une troisième méthode de production consiste en l'infection adénovirale de lignées d'encapsidation. Ces lignées ont intégré de façon stable le génome rep-cap (HeLa32) et parfois le plasmide vecteur. Quelque soit la méthode utilisée, la caractérisation précise des stocks d'AAVr a montré que les préparations d'AAVr étaient contaminées par des particules d'AAV ayant encapsidé les séquences rep-cap (0,1 à 1% des particules totales). Ces particules, appelées particules Rep Positive (Rep +) sont capables de se répliquer. Elles sont formées par recombinaison non homologue entre le plasmide rep-cap et les séquences ITR du plasmide vecteur (Allen *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). La délétion des séquences critiques des ITR impliquées dans ce mécanisme de recombinaison non homologue évite leur formation. Cependant les préparations d'AAVr restent contaminées par des particules d'AAV défectives pour la réplication mais ayant encapsidées les séquences rep-cap. Cela suggère que ces séquences peuvent être encapsidées en l'absence de séquences ITR et donc que d'autres éléments présents *en cis* permettent la réplication et l'encapsidation des gènes rep-cap. Une première étude effectuée au laboratoire a mis en évidence un élément de réplication (CARE, *Cis Acting Replication Element*) *en cis*. La région CARE fait 350 pb et comprend le promoteur p5 et une partie de la séquence codante 5' de rep (Nony *et al.*, 2001). Cette séquence, en l'absence des deux ITR, *in vitro* et *in vivo*, agit comme une origine de réplication rep dépendante et peut conduire à l'encapsidation du génome rep-cap (Nony *et al.*, 2003). Une encapsidation aspécifique de séquences plasmidiques a également été notée. La réplication du plasmide rep-cap serait initiée après fixation de Rep sur son site de liaison (RBS, *Rep Binding Site*) dans le promoteur p5. Cela entraînerait le clivage au niveau du site de résolution terminale (trs, *terminal resolution site*) en aval et initierait la réplication du plasmide entier.

Notre étude s'est inscrite dans la lignée de ces deux études effectuées au laboratoire. Outre confirmer les résultats précédents, notre étude avait pour principal objectif de caractériser les séquences plasmidiques encapsidées de façon non spécifique, et d'étudier leur devenir *in vivo*.

1.2 Encapsulation de séquences plasmidiques pendant la production d'AAVr

1.2.1 Après transfection transitoire

Nous avons analysé des stocks d'AAVr produits par les trois méthodes classiques de transfection transitoire : la triple transfection, la double transfection, et la double transfection suivie d'une infection adénovirale. Avant l'extraction d'ADN, les particules ont subi un traitement à la benzonase afin d'éliminer tous les contaminants ADN présents à l'extérieur des particules. Quelque soit la méthode de production utilisée, des séquences plasmidiques correspondant au gène de résistance à l'ampicilline (amp^R) ont été encapsidées. Elles ont été quantifiées par PCR quantitative et représentent 1 à 6% des particules totales. Des séquences rep ont été détectées : 0,3 à 1,2% des particules totales. La question, ensuite, était de déterminer l'origine de ces séquences amp^R encapsidées. Tous les plasmides utilisés pour la production portent le gène de résistance à l'ampicilline. Afin de différencier les séquences provenant du plasmide vecteur de celles provenant du plasmide *helper*, nous avons utilisé un plasmide vecteur portant le gène de résistance à la kanamycine (kan^R). Ce plasmide a été co-transfecté dans des cellules 293 avec le plasmide pDG portant le gène de résistance à l'ampicilline. Des séquences amp^R et kan^R ont été encapsidées dans le stock d'AAVr ainsi produit. Un nombre plus élevé de séquences kan^R a été détecté suggérant que le plasmide vecteur, portant les ITR, serait la source majeure de contaminants plasmidiques. Le faible pourcentage de séquences amp^R détectées pourrait donc s'expliquer par la délétion partielle du p5 dans le pDG. En effet nous avons utilisé le plasmide pDG comme plasmide *helper*. Celui-ci présente une délétion partielle du promoteur p5 limitant ainsi la répllication. Hors pour être encapsidé, le génome doit d'abord être répliqué.

1.2.2 En utilisant des lignées d'encapsidation

Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude sont dérivées des cellules HeLa. Elles ont intégré de manière stable dans leur génome les gènes rep-cap et sont infectées de façon latente par un AAVr codant pour la β -galactosidase d'*E.Coli* (Chadeuf *et al.*, 2000). L'infection de ces clones cellulaires avec un adénovirus sauvage permet la production d'AAV-lacZ. Cette méthode de production entraîne également l'encapsidation de séquences amp^R, représentant 3 à 7% des particules totales. Afin de déterminer l'origine des séquences plasmidiques encapsidées avec cette méthode de production, nous avons analysé les particules AAV produites par infection de cellules HeRC32 avec un adénovirus. Ces cellules ont intégré de façon stable dans leur génome plusieurs copies du plasmide rep-cap entier en position tête-queue. Même en l'absence de plasmide vecteur des séquences plasmidiques se trouvent encapsidées. Une amplification de 100 fois du génome rep-cap intégré dans les cellules HeLa32 est observé après infection par un adénovirus (Tessier *et al.*, 2001). De la même manière, nous avons montré une amplification des séquences plasmidiques intégrés dans ces mêmes cellules après infection adénovirale. L'encapsidation de ces séquences serait donc également dépendante de l'amplification induite par l'infection.

1.2.3 Conclusions

Au cours de la production d'AAVr des séquences plasmidiques sont encapsidées quelque soit la méthode utilisée. Cette encapsidation aspécifique est majoritairement liée à la présence des ITR, mais elle peut également être liée à d'autres origines de répllication. La présence de séquences amp^R liées à l'ITR dans nos stocks d'AAV-LacZ nous a permis de montrer que les séquences plasmidiques étaient capables de se répliquer.

1.3 Détection de séquences amp^R dans les tissus après transfert de gène

Après avoir montré l'existence de séquences plasmidiques encapsidées dans les stocks d'AAVr produits, nous avons voulu vérifier le devenir de ces séquences *in vivo*. Nous avons ainsi analysé deux types de tissus différents : le muscle et le cerveau de différentes espèces (murine, canine et primate) injectés par des sérotypes différents (AAV2/2, AAV2/1 et

AAV5/5) portant des transgènes différents (Epo, ALD et Idua). De plus, les préparations d'AAVr utilisées pour ces études ont été produites par transfection transitoire ou avec des lignées d'encapsidation. Sur chaque échantillon, un gène endogène, le transgène et les potentielles séquences amp^R ont été mesurés par PCR classique puis PCR quantitative. La sensibilité de la PCR quantitative est la même pour tous les couples de *primers*, permettant ainsi de comparer les différentes PCR. Quelque le soit le sérotype et le tissu injecté, des séquences amp^R ont été détectées. Le nombre de copies d' amp^R était plus élevé au site d'injection et décroissait à distance, de manière similaire à ce qui est observé avec le transgène. Cependant, de manière surprenante, le pourcentage de copies amp^R mesuré *in vivo* est largement supérieur à celui mesuré dans les stocks d'AAVr originaux. Il semblerait que la transduction par les particules amp^R soit privilégiée. L'interprétation de ces résultats est délicate. Les particules amp^R sont présentes dans les stocks AAV avec une faible concentration et sont « silencieuses ». Elles portent la séquence du gène de résistance à l'ampicilline qui ne peut pas s'exprimer puisqu'il est sous contrôle d'un promoteur bactérien. Elles pourraient donc éventuellement échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte ou au système de dégradation intracellulaire favorisant ainsi la transduction.

Des jonctions ITR-séquence plasmidique ont pu être détectées dans les stocks d'AAVr. Nous avons vérifié si ces jonctions pouvaient être retrouvées *in vivo* et si elles étaient fonctionnelles. Des bactéries DH5 α ont été transformées avec différentes concentrations d'ADN extrait des tissus injectés puis sélectionnées sur des boîtes contenant de l'ampicilline. Si les séquences amp^R sont fonctionnelles et peuvent être mobilisées, elles vont conférer la résistance à l'ampicilline aux bactéries qui pourront ainsi pousser sur les boîtes. Une colonie amp^R a ainsi été obtenue à partir de l'ADN de l'échantillon présentant le nombre de copies amp^R le plus élevé. La séquence complète du plasmide ainsi récupérée a été déterminée. Il contenait la totalité de la séquence plasmidique du plasmide AAVr-Idua parental encadrée par les deux ITR. Une partie du promoteur de la cassette d'expression persistait également. Les jonctions ITR-plasmide retrouvées dans les stocks AAVr et *in vivo* montraient des délétions dans la séquence de l'ITR ; la région contenant le site RBS étant toujours conservée. Les délétions peuvent être les conséquences de la difficulté à séquencer les régions GC riches des ITR.

1.4 Conclusions et perspectives

Les lots de vecteurs utilisés en clinique répondent à un cahier des charges plus drastique que celui d'une production classique. Les vecteurs doivent être produits massivement, avec le taux d'impuretés le plus faible. Notre étude a montré une encapsidation aspécifique de séquences plasmidiques lors de la production d'AAVr, indépendamment de la méthode de production et du sérotype utilisés. Ces séquences sont transférées et persistent *in vivo* après injection d'AAVr dans différents tissus. Bien que la présence de ces séquences procaryotiques n'est pas suscitée de réaction inflammatoire chez tous les animaux analysés à plus ou moins long terme (entre 1 mois et 5 mois post-injection), il apparaît primordial de les limiter. Nous avons montré que ces séquences plasmidiques et en particulier le gène de résistance à l'ampicilline étaient présents de façon stable dans les tissus et pouvaient être transférées à des bactéries. Il s'agit à priori d'un événement rare, car nous l'avons mis en évidence uniquement pour l'échantillon présentant le nombre de copies d' amp^R le plus élevé. Il semblerait donc judicieux de limiter la génération de particules amp^R lors de la production d'AAVr et éventuellement d'utiliser un autre gène de résistance aux antibiotiques.

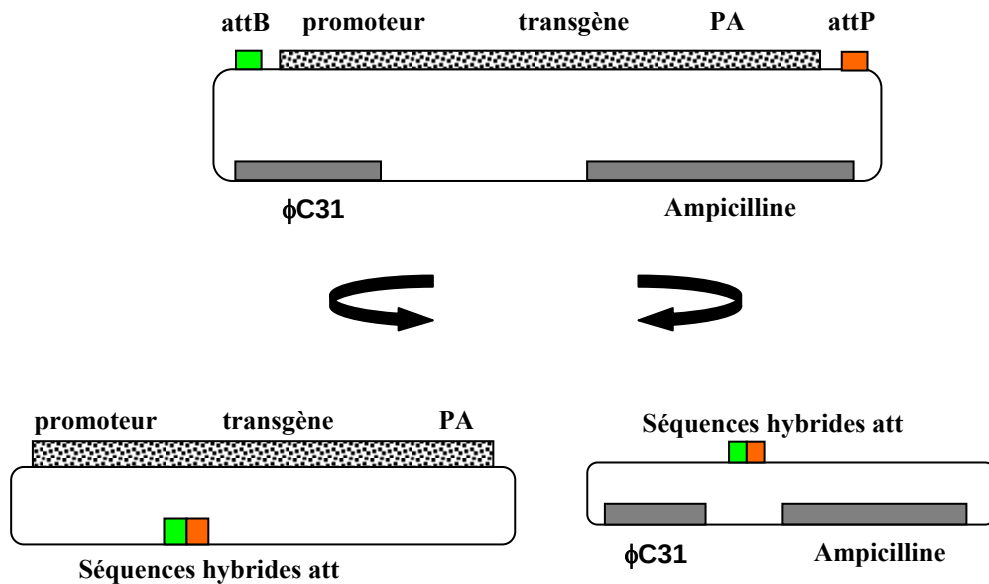
Pour pouvoir être encapsidées, les séquences plasmidiques sont d'abord répliquées de manière rep dépendante. Le mécanisme permettant leur réplication n'est pas clairement élucidé. Il semblerait, qu'il y ait une réplication préférentielle de la cassette d'expression comprise entre les ITR et une réplication du plasmide entier à moindre niveau. La réplication de séquences plasmidiques a été précédemment observée dans des études de réplication *in vitro* de plasmide AAV (Ward *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1998).

Pour limiter la génération de ces particules AAV indésirables, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Une stratégie pourrait être de modifier la séquence du plasmide en augmentant sa taille, ou en enlevant tous les sites de fixation de rep (RBS) non spécifiques. L'augmentation de la taille du plasmide vecteur à 7000 pb permet d'éliminer l'encapsidation aspécifique (Smith- Abstract ASGT- mai 2003). La plupart des plasmides utilisés dérivent du plasmide pBR322 qui présentent des sites RBS (McCarty *et al.*, 2004). En effet ces séquences RBS peuvent favoriser la réplication et donc l'encapsidation de séquences procaryotiques. Une seconde stratégie pourrait être d'établir des clones cellulaires d'encapsidation sans séquence plasmidique intégrée. Nous avons essayé de développer cette stratégie au laboratoire. La séquence rep-cap seule ou associée à une origine de réplication a été

transfectée dans des cellules HeLa avec un plasmide portant le gène de résistance à la néomycine permettant la sélection des clones. Des clones cellulaires ont ainsi été obtenus. Quelques uns ont intégré la séquence rep-cap, mais le génome n'a pas été amplifié après infection adénovirale. Aucune production d'AAVr-LacZ n'a été obtenue avec ces clones cellulaires. Cette stratégie n'a pas été poursuivie au laboratoire par la suite. Une dernière stratégie pourrait être d'éliminer le gène de résistance à l'ampicilline du plasmide vecteur par un mécanisme de recombinaison intramoléculaire (figure17). Ce mécanisme de recombinaison est médié par la recombinaise du phage ϕ C31 (Chen *et al.*, 2003). La cassette d'expression du plasmide est encadrée par un site d'attachement bactérien (attB) et un site d'attachement du phage (attP). Ce plasmide contient également la séquence de la recombinaise ϕ C31 et le gène de résistance à l'ampicilline. L'ajout de l'inducteur L-(+)-arabinose permet la production de la recombinaise qui va permettre la recombinaison entre le site attB et attP, aboutissant à la formation de deux cercles, l'un contenant la cassette d'expression et l'autre les séquences bactériennes. Ce mécanisme est efficace à 97%.

Finalement aucune de ces stratégies n'a été retenue pour la production des vecteurs AAVr au laboratoire. Toutefois le gène de résistance à l'ampicilline a été remplacé par le gène de résistance à la kanamycine sur les plasmides vecteurs.

Figure 17: Principe de la recombinaison intramoléculaire



Adapté de Chen *et al*, 2003.

L'ajout de l'inducteur L-(+)-arabinose permet la production de la recombinase qui va permettre la recombinaison entre le site attB et attP, aboutissant à la formation de deux cercles, l'un contenant la cassette d'expression et l'autre les séquences bactériennes.

Deuxième article

Gene Therapy of the Brain in the Dog Model of Hurler's Syndrome

Carine Ciron, Nathalie Desmaris, Marie-Anne Colle, Sylvie Raoul, Béatrice Joussemet, Lucie Vérot, Jérôme Ausseil, Roseline Froissart, Françoise Roux, Yan Chérel, Nicolas Ferry, Yaouen Lajat, Bertrand Schwartz, Marie-Thérèse Vanier, Irène Maire, Marc Tardieu, Philippe Moullier and Jean-Michel Heard. 2006, *Annals of neurology*, 60: 204-213

2 Résultats et discussion du deuxième article :

2.1 Objectifs :

Comme nous venons de le voir, les vecteurs dérivés des AAV sont très attractifs pour le transfert de gène puisque ce sont des vecteurs naturellement déficients pour la réplication et non pathogènes pour l'homme. Ils peuvent transduire des cellules en division ou quiescentes (McCown *et al.*, 1996) et entraîner une expression soutenue du transgène bien qu'ils s'intègrent rarement dans le chromosome de la cellule hôte (Wu *et al.*, 1998). La MPS I est une affection neurodégénérative. L'objectif est donc d'apporter le vecteur viral codant pour l'enzyme déficiente avec la plus grande diffusion dans l'encéphale et un nombre d'injections cliniquement envisageable.

L'activité enzymatique Idua a pu être restaurée dans la totalité du cerveau de souris MPS I après injection d'un AAVr 2-Idua et d'un AAVr 5-Idua dans le striatum (Desmaris *et al.*, 2004). L'activité enzymatique est plus forte, et les zones corrigées plus étendues chez les souris MPS I injectées avec l'AAVr 5. Les deux sérotypes permettent de rétablir les concentrations en GAG et en GM2 et GM3, et de corriger les lésions de surcharge dans tout le SNC.

Le cerveau d'un enfant de 1 an étant 1000 à 2000 fois plus volumineux qu'un cerveau de souris, il était nécessaire d'évaluer l'innocuité, la biodistribution, et l'efficacité thérapeutique d'une injection intracérébrale dans un modèle animal de grande taille, le chien MPS1. Ces chiens MPS I présentent un déficit en α -L Iduronidase (Idua) entraînant l'accumulation de GAG (dermatane et héparane sulfate) ainsi que des gangliosides, GM2 et GM3. Les lésions du SNC se caractérisent par une surcharge dans les neurones, les cellules gliales et les macrophages périvasculaires. Les atteintes neuropathologiques de ces chiens sont comparables à celles observées chez les patients MPS I (Shull *et al.*, 1984). Ce modèle canin est également particulièrement intéressant au niveau immunologique. En effet ces chiens MPS1 développent des anticorps anti-Idua circulant suite à l'administration de l'enzyme humaine ou canine par voie intraveineuse (Kakkis *et al.*, 1994), de manière similaire à ce qui est observé chez les enfants MPS I traités par enzymothérapie (Kakavanos *et al.*, 2003).

L'AAVr 5 diffusant mieux dans le SNC de souris adulte que l'AAVr 2, nous avons utilisé l'AAVr 5 pour évaluer le transfert de gène chez les chiens MPS I. L'objectif de cette étude était de déterminer la dispersion du vecteur et de l'enzyme après des injections stéréotaxiques uniques ou multiples d'un vecteur AAVr 5/5-Idua dans le cerveau de chiens MPS I, d'étudier la correction des lésions de surcharge et des désordres biochimiques et enfin d'évaluer l'immunogénicité de cette approche thérapeutique.

2.2 Stratégie expérimentale

Cette étude a été effectuée sur 18 chiens : 13 chiens MPS I et 5 chiens normaux. Parmi les chiens MPS I, 7 d'entre eux ont été injectés avec un vecteur AAVr 5/5-Idua à l'âge de 3 ou 4 mois. Les 6 autres n'ont pas été traités et ont permis de caractériser les lésions neurologiques et leur évolution en fonction de l'âge. Les chiens traités ont reçu une ou plusieurs injections intracérébrales d'un vecteur AAVr 5/5-Idua. La cassette d'expression étant constituée du promoteur PGK murin, de l'ADNc de l'Idua humaine, de la séquence WPRE, et du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine, encadrés par les ITR de l'AAVr 5. Le gène PGK code pour une enzyme, la phosphoglycérate kinase, intervenant dans la glycolyse. Il s'agit d'un promoteur ubiquitaire. L'expression de la protéine est augmentée par l'insertion de la séquence WPRE qui a pour rôle de stabiliser les ARN messagers et faciliter leur transport dans le cytoplasme (Zufferey 1999). Six des chiens traités (D6, D7, D8, D9, D11 et D12) ont reçu 4 injections d'AAVr 5/5-Idua ; 2 sites par hémisphère : 1 ciblant le putamen et l'autre le centre semi-ovale. Pour chaque injection nous avons effectué un dépôt profond et un dépôt superficiel, avec une vitesse d'administration de 2 μ l/min. Tous ces chiens ont reçu une dose équivalente de vecteur (48×10^{10} particules totales). D10, quant à lui, n'a reçu qu'une seule injection du vecteur AAVr 5-Idua (6×10^{10} particules totales) dans le putamen de l'hémisphère gauche. Les coordonnées d'injection ont été établies à partir d'une IRM effectuée sur un chien beagle. Les repères sont basés sur la suture coronale.

Une réponse immunitaire contre la protéine Idua ayant été précédemment observé chez ces chiens (Shull *et al.*, 1994), un traitement immunosuppresseur a été administré avant et durant tout le temps de l'étude. Quatre des chiens traités (D6 à D9) et un chien non traité (D5) ont reçu un traitement immunosuppresseur fort combinant la prise de mycophénolate

mofétil et de cyclosporine A. Ces chiens présentaient en moyenne une cyclosporinémie de 400 ng/ml. Les trois autres chiens traités (D10 à D12) ont reçu un traitement immunosuppresseur modéré à base de cyclosporine A seule. Ils présentaient des niveaux de cyclosporinémie de 80 ng/ml. Les traitements immunosuppresseurs ont débuté 15 jours avant les injections intracérébrales.

Les chiens MPS I ont été euthanasiés à différents temps post-injection, entre 1 mois et 8 mois post-injection. Les hémisphères cérébraux ainsi que le cervelet ont été séparés sagitalement. Des coupes coronales sériées de 4 mm ont été effectuées sur chacun d'eux. Chaque tranche impaire a été divisée en 4 fragments. Sur chaque fragment, la distribution du transgène et l'expression d'Idua ont été déterminées par PCR quantitative et par dosage de l'activité enzymatique. Une cartographie de diffusion du transgène et de l'enzyme a ainsi été établie. La correction des lésions de surcharge, les concentrations en GAG et gangliosides ont été estimées sur les tranches paires. La recherche d'anticorps anti-Idua a été effectuée par un test ELISA dans les extraits de cerveau.

2.3 Transfert de gène chez les chiens MPS I ayant reçu une immunosuppression modérée :

Le chien « pilote » D10, à la différence de D11 et D12, n'a reçu qu'une seule injection intracérébrale. L'objectif était davantage de vérifier la faisabilité de la procédure chirurgicale que d'obtenir une distribution de l'enzyme dans la totalité du SNC. Le chien D10 a été euthanasié 1 mois et demi après l'injection, et D11 et D12 à 3 mois post-injection. Les sites d'injection correspondent à la tranche 5 (putamen) et à la tranche 9 (centre semi-ovale). Chez ces 3 chiens nous avons détecté par PCR quantitative un nombre de copies de transgène plus élevé dans les tranches encadrant le site d'injection : maximum 0,7, 1,55 et 17,9 pour D10, D11 et D12 respectivement. Pour D11 et D12, qui ont reçu quatre injections d'AAVr 5/5-Idua, le transgène est détecté sur la quasi-totalité du cerveau. Ces premiers résultats montrent que quatre injections stéréotaxiques d'un vecteur AAVr 5/5 permettent d'apporter le génome du vecteur sur un large volume cérébral.

Nous avons ensuite évalué l'activité enzymatique Idua chez ces chiens. L'activité enzymatique Idua chez un chien normal est de 0,29 unité/mg de protéines. Cette activité est

homogène dans toutes les régions du cerveau. Aucune activité enzymatique ou très faible n'a été détectée chez D10, D11 et D12. Nous avons pu mettre en évidence des anticorps dirigés contre l'Idua dans les extraits de cerveau de ces chiens. Le traitement immunosuppresseur mis en place n'a pas été suffisant pour éviter le développement d'une réponse humorale contre le produit du transgène. Il est possible que cette réponse humorale ait été accompagnée d'une réponse cellulaire contre les cellules transduites, mais nous ne l'avons pas mise en évidence. L'analyse histologique de sections de cerveau en paraffine a montré des signes d'inflammation avec neuronophagie, infiltration péri-vasculaire par des macrophages, des lymphocytes et des cellules plasmocytaires. Aucune correction des lésions de surcharge n'est observée.

Ces résultats ont conduit à l'injection de quatre autres chiens MPS I avec le vecteur AAVr 5 en leur administrant un traitement immunosuppresseur fort

2.4 Transfert de gène chez les chiens MPS I ayant reçu une immunosuppression forte :

D6, D7, D8 et D9 ont reçu 4 injections d'AAV5-Idua. Ils ont été euthanasiés à différents temps post-injection : D6 à 1 mois, D7 et D8 à 3 mois, D9 à 8 mois post-injection. Aucune inflammation ou réponse humorale contre l'Idua n'a été observée chez ces 4 chiens.

➤ Distribution du transgène et de l'enzyme

Le transgène est détecté sur 50 à 100% de chaque hémisphère. La diffusion du génome vecteur dans des sites distants des points d'injection est sûrement liée à différents types de transport. Le vecteur diffuse probablement majoritairement, de manière passive sans utiliser les voies axonales. Diverses études ont mis en évidence l'existence d'un transport antérograde ou rétrograde de l'AAVr après injection dans le striatum et l'hippocampe notamment (Chamberlin *et al.*, 1998; Burger *et al.*, 2004; Hadaczek *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004). On peut donc supposer que la diffusion du vecteur dans notre étude est également liée en partie à un transport axonal actif de l'AAVr.

Nous avons détecté un nombre de copies du transgène plus élevé dans les tranches encadrant le site d'injection, avec un nombre maximal de copies par cellule de 3269 pour D6, 302 copies pour D7, 784 copies pour D8 et 643 copies pour D9. Le nombre de copies de transgène au site d'injection diminue de 4 à 10 fois entre le 1^{er} et le 3^{ème} mois post-injection, puis reste stable au cours du temps. Un mois après l'injection toutes les copies ne sont pas transcriptionnellement actives. Tous les ADN simple brin non appariés sont dégradés dans les premières semaines suivant l'injection. A trois mois nous n'observons plus que les formes double brin stables. Nos résultats sont similaires à ce qui peut être observé après transfert de gène par l'AAV dans le muscle (Xiao *et al.*, 1996) ou le foie (Miao *et al.*, 1998).

Chez ces 4 chiens nous avons détecté une activité enzymatique Idua, à des niveaux supra-physiologiques parfois. L'expression du transgène augmente au cours du temps. Les tranches pour lesquelles nous avons détecté un nombre de copies du transgène supérieur à 10 présentent des activités enzymatiques très élevées. Pour D7 et D9 nous avons détecté une activité Idua dans la totalité du SNC, y compris dans les tranches où le transgène n'avait pas été détecté. Ceci s'explique par le phénomène de correction croisée. En effet une cellule transduite va pouvoir exprimer l'Idua qui sera sécrétée et recaptée par les cellules avoisinantes non transduites (Fratantoni *et al.*, 1968). Ce mécanisme de sécrétion, diffusion passive et captage ne permet pas aux enzymes d'être transportées sur de longues distances. Il est possible que l'Idua diffuse également par transport axonal. En effet le transport rétrograde d'une autre enzyme lysosomale, la β -glucuronidase a été rapportée après injection du vecteur AAVr 2- β -glu dans l'hippocampe ou dans l'œil (Passini *et al.*, 2002; Hennig *et al.*, 2003). Les chiens D6 et D7, à la différence de D8 et D9, présentent une activité enzymatique seulement dans les tranches avec un grand nombre de copies de transgène. L'absence de détection de l'Idua dans les tranches avec un faible nombre de copies de vecteur est vraisemblablement liée à la faible sensibilité du test enzymatique, plutôt qu'à l'absence d'expression du transgène.

L'Idua est exprimée majoritairement chez les chiens à des niveaux physiologiques (proche de 0,29 U/mg de protéines). Cependant aux sites d'injection l'activité enzymatique est très forte, jusqu'à 1000 fois l'activité enzymatique normale pour D9. Nous n'avons pas observé de lésions lysosomiales secondaires à la surexpression d'Idua dans les chiens MPS I. La toxicité potentielle liée à une surexpression des enzymes lysosomales après transfert de gène n'est pas vraiment documentée. Des lignées de souris transgéniques surexprimant la β -

glucuronidase ont été développées afin d'étudier les conséquences d'une surexpression d'une enzyme lysosomale. Ces souris montrent une activité enzymatique β -glu très largement supérieure à la normale (des milliers de fois l'activité enzymatique normale) (Vogler *et al.*, 2003). La surexpression de la β -glu chez ces souris transgéniques entraîne l'apparition de lésions de surcharge caractéristiques des maladies de surcharge lysosomale. Une expression secondaire de certaines enzymes lysosomales, comme la β -hexoaminidase, l' α -galactosidase et l' α -mannosidase, est également notée. Malgré cela, ces souris ont une durée de vie et un phénotype normal. Certaines souris ont développé des tumeurs qui s'avèrent liées à l'insertion du transgène et non à la surexpression de la protéine. Ces résultats suggèrent que la surexpression de β -glu est bénigne, même si elle atteint un niveau entraînant l'apparition de lésions de surcharge. Il est peu probable d'obtenir des niveaux d'expression aussi élevés dans de multiples tissus après transfert de gène. Dans notre étude nous n'avons pas cherché à évaluer les niveaux d'activité d'autres enzymes lysosomales. Quelles peuvent être les conséquences de la surexpression d'une enzyme lysosomale après transfert de gène sur l'activité enzymatiques des autres hydrolases ? Une altération de l'activité des autres enzymes lysosomales est observée chez les malades et dans les modèles animaux atteints de MPS suite au déficit d'une enzyme lysosomale (Constantopoulos and Dekaban, 1978; Hultberg *et al.*, 1980; Shull *et al.*, 1984). Ce déséquilibre est présent dans tous les organes. La raison de cette accumulation secondaire n'est pas bien élucidée. Toutes les enzymes ne sont pas perturbées. L'hyperactivité enzymatique secondaire peut être due à une régulation positive des enzymes dans les voies affectées, soit pour compenser l'activité de l'enzyme déficiente, soit à cause d'une hypertrophie du système lysosomal (Winchester, 2001). La diminution de l'activité enzymatique des autres enzymes lysosomales après le rétablissement du déficit enzymatique primaire a déjà été observée chez des souris traitées par substitution enzymatique (Vogler *et al.*, 1993), greffe de moelle osseuse (Birkenmeier *et al.*, 1991), implantation de microcapsules sécrétant la β -glu (Ross *et al.*, 2000) ou thérapie génique dans le SNC (Wolfe *et al.*, 1992; Bosch *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2002; Cressant *et al.*, 2004). *In vitro*, la surexpression de l'Idua (Kakkis *et al.*, 1994) et de la N-acétylgalactosamine-4-sulfatase (Anson *et al.*, 1993) entraîne un déséquilibre des autres hydrolases. Ces observations ne sont pas confirmées *in vivo*. Une étude effectuée chez des souris MPS IIIB montre que la surexpression de l' α -N-acétyl-glucosaminidase (Naglu) n'altère pas l'expression des autres hydrolases et même au contraire qu'elle permet de rétablir leur activité enzymatique (Cressant *et al.*, 2004).

Il semblerait donc, à la vue des données de la littérature et de nos propres observations, que la surexpression d'une enzyme lysosomale après transfert de gène n'induit pas d'effets délétères pour le lysosome.

➤ Correction des lésions de surcharge

Dans le cas de la MPS IH, des lésions de surcharge sont observées dans le système nerveux central. Les neurones présentent un gonflement des corps cellulaires secondaire à l'accumulation de GAG. La présence de méganeurites, de sphéroïdes axonaux (dilatation segmentaire axonale) et de bourgeonnement de neurites sont rapportés (Walkley *et al.*, 1991; Walkley, 1998, 2003). La plupart des astrocytes ont un noyau hypertrophié. Occasionnellement certains présentent un cytoplasme vacuolisé. Une accumulation de cellules mononucléées est observée autour des vaisseaux intraparenchymateux et leptoméningés (Shull *et al.*, 1984). Les données histologiques du SNC chez les chiens atteints de MPS I sont peu documentées. Nous avons tout d'abord étudié les lésions de surcharge chez des chiens MPS I non traités à différents âges : 1 mois, 3 mois, 11 mois et 12 mois. Les analyses histopathologiques ont été effectuées à partir de différentes colorations. L'analyse en microscopie électronique de coupes semi-fine de 1 µm colorées au bleu de toluidine est la plus fine pour mettre en évidence les lésions de surcharge dans le SNC. Elle est utilisée pour analyser spécifiquement des régions. Cette technique n'est pas adaptée pour analyser la totalité du cerveau. Nous avons donc effectué l'analyse semi-quantitative des lésions de surcharge sur des coupes en paraffine de 4 µm d'épaisseur avec une coloration hématoxyline-éosine. Nous nous sommes intéressés aux principales lésions observées dans le SNC des MPS I : la présence de vacuoles dans les neurones et les plexus choroïdes, et l'infiltration des espaces périvasculaires par des macrophages. Un barème a été établi pour déterminer la sévérité des lésions, de 0 à 3. Zéro correspond à un chien sain sans lésion de surcharge, et 3 correspond à la présence de vacuoles dans plus de 80% des cellules dans le cortex et les plexus choroïdes et l'infiltration de l'espace périvasculaire des vaisseaux par plus de 5 macrophages. Les 5 chiens non traités présentent des lésions neurologiques. Elles sont déjà présentes à 1,6 mois et leur sévérité est équivalente entre 3 et 12 mois. Les chiens traités ont ensuite été analysés. Tous présentent une amélioration ou une correction des lésions neuropathologiques. La sévérité des lésions est diminuée dans toutes les régions analysées sauf dans le cervelet pour D6 et D8. Il n'y a plus d'infiltration de l'espace périvasculaire par des macrophages pour D7 et D8. Les plexus choroïdes sont normaux pour D7 et D9.

Les lésions de surcharge résiduelles ont été quantifiées dans le noyau caudé après coloration de coupes en paraffine de 4 µm avec du bleu de Luxol. Le bleu de Luxol colore l'accumulation des GAG et des gangliosides. Nous avons montré que le nombre de cellules réactives à ce colorant était significativement plus faible pour les chiens traités par rapport aux chiens MPS I non traités.

➤ Correction de l'accumulation en GAG et gangliosides

Le déficit en Idua entraîne l'accumulation de GAG, héparane et dermatane sulfates, dans les lysosomes. Nous avons déterminé la concentration en GAG dans les extraits de cerveau de chiens normaux, des chiens MPS I non traités et des chiens MPS I traités. Les chiens non traités montrent une concentration en GAG très élevée (>8 µg/mg de tissu sec) par rapport au chien normal (3 µg/mg de tissu sec). Les chiens MPS1 traités présentent une concentration en GAG équivalente à celle du chien normal.

Nous avons également voulu connaître l'effet de l'injection d'AAVr 5-Idua sur le métabolisme des gangliosides. Les gangliosides jouent un rôle important dans les interactions cellule-cellule, la régulation des récepteurs tyrosine kinase et la différenciation cellulaire (Yu and Saito, 1992; Sandhoff and van Echten, 1993; Kolter *et al.*, 2002). Une accumulation des gangliosides GM2 et GM3 a été observée dans le SNC des modèles animaux atteints de MPS et chez l'homme (Constantopoulos and Dekaban, 1978; Haskins *et al.*, 1982; Shull *et al.*, 1984; Constantopoulos *et al.*, 1985; Haust and Gordon, 1986; Russell *et al.*, 1998; Frisella *et al.*, 2001; Liour *et al.*, 2001; Vogler *et al.*, 2001). Cette accumulation participe aux anomalies cérébrales liées à la neurodégénérescence de ces maladies : changements morphologique des neurones (apparition de dendrites ectopiques, de sphéroïdes axonaux, de méganeurites) (Walkley *et al.*, 1991; Walkley, 1998, 2003), mort cellulaire par apoptose (Huang *et al.*, 1997a; Wada *et al.*, 2000) ou par un stress cellulaire induit par une inhibition de la fixation du Ca^{2+} (Pelled *et al.*, 2003). La surcharge en gangliosides GM2 a été observée dans les lysosomes alors que celle des GM3 est localisée dans les endosomes tardifs (Gondre-Lewis *et al.*, 2003; Walkley, 2003). Les enzymes impliquées dans le catabolisme des GAG ne sont pas nécessaires à la dégradation des gangliosides GM2 et GM3. La seule hypothèse émise est que les concentrations excessives en GAG, en particulier les HS, entraîneraient une diminution secondaire des hydrolases impliquées dans la dégradation des glycolipides, la sialidase, la

GalNacT et le neuraminidase (Kint *et al.*, 1973; Avila and Convit, 1975; Constantopoulos and Dekaban, 1978; Baumkotter and Cantz, 1983; Liour *et al.*, 2001).

Nous avons examiné l'accumulation de gangliosides GM2 et GM3 au cours du temps dans des extraits de cerveaux de chiens MPS I non traités comparés à des chiens normaux. Les niveaux de gangliosides augmentent avec l'âge des chiens MPS I mais pas chez les chiens normaux. L'apport d'Idua dans le cerveau des chiens MPS I a entraîné une normalisation des gangliosides. A l'âge de l'injection (3 mois), les concentrations en gangliosides ne sont pas encore très élevées. Ces résultats apportent, cependant, un argument en faveur de l'efficacité du traitement, à la fois préventif et curatif.

2.5 Conclusions

Dans cette étude nous avons montré, pour la première fois, dans un modèle canin MPS I que 4 injections stéréotaxiques d'un vecteur AAVr 5/5-Idua permettent d'apporter le vecteur et l'enzyme sur la quasi-totalité du cerveau. L'expression d'Idua permet une réduction ou une correction complète des lésions de surcharge dans le cerveau entier, ainsi qu'une normalisation des concentrations en GAG et gangliosides. Cette étude a également mis en évidence les risques immunologiques liés à l'expression du transgène et la nécessité d'administrer un traitement immunosuppresseur fort. Le système nerveux central n'est pas le site immunologiquement privilégié décrit dans la littérature. Il a longtemps été considéré comme tel, du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique. Le cerveau n'est pas constitué de tissus lymphoïdes et le parenchyme ne contient pas normalement de cellules dendritiques présentatrices d'antigène. Les antigènes présents peuvent seulement stimuler une réponse immunitaire transitoire innée, incluant la libération de cytokines et le recrutement de macrophages et de neutrophiles, sans provoquer le développement d'une réponse immunitaire adaptative (Lowenstein, 2002). A la différence, la présence d'agents infectieux dans les plexus choroïdes, les ventricules, le LCR et les méninges entraîne la formation d'une réponse immunitaire innée et adaptative. Cependant ce dogme a été ébranlé ces dernières années par différentes études montrant l'apparition d'une réponse immunitaire et/ou inflammatoire à la suite d'une injection intraparenchymateuse de vecteurs AAV (Peden *et al.*, 2004; Sanftner *et al.*, 2004). Il est possible que la rupture transitoire de la barrière hémato-encéphalique permette le passage de cellules dendritiques et de lymphocytes dans le parenchyme.

L'apparition d'une réponse humorale dirigée contre la capsid de l'AAV2 a été décrite après des injections répétées dans le cerveau de rongeurs (Mastakov *et al.*, 2002b; Peden *et al.*, 2004; Sanftner *et al.*, 2004). Récemment, un essai de phase de I sur 10 patients atteints de la maladie de Canavan a montré l'apparition de faibles titres d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid chez 3 patients après injection d'un vecteur AAVr 2-aspartoacylase (McPhee *et al.*, 2006). Une réponse immunitaire contre le produit de transgène est plus rarement décrite dans le SNC. Elle dépendra notamment de l'immunogénicité du produit de transgène. Nos résultats montrent que l'Idua est très immunogène. Ces observations sont en accord avec les résultats publiés chez le chien (Kakkis *et al.*, 1996) et chez l'homme (Kakkis *et al.*, 2001a; Kakavanos *et al.*, 2003) après thérapie par substitution enzymatique. Dans le cas de la thérapie par substitution enzymatique les anticorps produits n'altèrent pas l'efficacité du traitement. Une expression plus forte de la protéine, une voie d'abord différente explique probablement cette réponse immunitaire accrue après injection intracérébrale d'un vecteur AAV. La transplantation de cellules hématopoïétiques modifiées par un vecteur rétroviral portant l'ADNc de l'Idua canine (Lutzko *et al.*, 1999a; Lutzko *et al.*, 1999b) ou l'implantation dans les ventricules de microcapsules exprimant l'Idua canine (Barsoum *et al.*, 2003) entraîne également une réponse immunitaire forte contre l'Idua, bloquant son expression.

Les résultats obtenus après injection d'un vecteur AAVr 5/5-Idua dans le SNC de chiens MPS I vont conduire à la mise en place d'un essai clinique chez les patients MPS I Hurler. Un traitement immunosuppresseur sera indispensable en clinique pour traiter les enfants atteints de MPS I. Une méthode de tolérisation immunitaire a été développée chez les chiens MPS I (Kakkis *et al.*, 2004a). Ce protocole d'induction de tolérance pourrait être envisagé sur les patients MPS I. Ce traitement consisterait en l'injection d'immunosuppresseurs (ciclosporine A et azathioprine) pendant 60 jours en association avec l'infusion d'enzyme à faible dose, puis en l'injection intracérébrale du vecteur AAV. Notre approche thérapeutique permet seulement de corriger les lésions neuropathologiques, hors il s'agit d'une maladie ayant des atteintes multisystémiques. L'injection intracérébrale d'AAVr-Idua sera donc associée à une enzymothérapie. Une autre alternative pourrait être de combiner l'injection intracérébrale avec une greffe de cellules hématopoïétiques, qui pourront induire une tolérance vis-à-vis de l'Idua.

2.6 Perspectives

En vue de l'essai clinique sur des patients MPS I Hurler, un certain nombre de points restent à valider : produire les lots de vecteur en conditions GMP, effectuer les études de toxicologie chez le rat, déterminer les patients pouvant être inclus dans l'essai.

Les études d'efficacité du transfert de gène dans le modèle canin MPS I ont été effectuées avec un vecteur AAVr 5/5 présentant les ITR de l'AAV 5. Ceux-ci étant moins bien caractérisés que ceux de l'AAV2, pour obtenir des lots de vecteurs produits en condition GMP nous avons opté pour l'utilisation d'un vecteur AAVr 2/5. La capside est inchangée, mais la cassette d'expression est maintenant encadrée par les ITR de l'AAV2. Bien que le tropisme, et l'efficacité de transduction doivent rester les mêmes, nous avons testé l'efficacité de transduction du vecteur AAVr 2/5 dans le SNC de chiens MPS I. Seize chiens ont reçu 4 injections d'AAVr 2/5 Idua, 2 d'entre eux étaient des chiens sains. L'objectif, dans le cas des chiens sains, est de vérifier la tolérance à long terme de notre traitement. Cette étude ne peut pas être effectuée sur les chiens MPS I du fait de leur durée de vie limitée liée aux atteintes multiorganiques. Un chien (D21) a reçu un traitement immunosuppresseur à base de MMF seul. Tous les autres ont reçu un traitement immunosuppresseur fort : MMF + cyclosporine A. La moyenne d'âge d'injection des chiens MPS I était plus élevée (7,5 mois) que pour les chiens du premier groupe injectés avec l'AAVr 5/5.

Pour les 15 chiens fortement immunosupprimés, le transgène est détecté en moyenne sur 87% du cerveau et l'activité enzymatique sur 61%. Il n'y a pas de différences entre les chiens injectés par l'AAVr 5/5 et l'AAVr 2/5, qu'il s'agisse de la distribution du vecteur dans le cerveau ou du nombre moyen de copies de vecteur. Le chien D21, immunosupprimé avec le MMF seul, ne présente aucune activité enzymatique, malgré la présence du transgène dans le cerveau. Des anticorps dirigés contre l'Idua ont pu être détectés, et le faible nombre de copies de vecteur retrouvé suggère également une réponse cellulaire contre les cellules transduites.

La vacuolisation neuronale a été évaluée à proximité du site d'injection dans le noyau caudé pour l'AAVr 2/5 en quantifiant le nombre de neurones positifs au bleu de Luxol par mm². L'évaluation à distance du site d'injection de l'étendue de la correction a été effectuée par l'analyse semi-quantitative des lésions de vacuolisation neuronale et d'infiltration macrophagique périvasculaire selon un protocole identique à celui des chiens injectés avec

l'AAVr 5/5. Les résultats montrent qu'à proximité du site d'injection la surcharge neuronale est corrigée pour les chiens MPS I traités par l'AAVr 2/5 par rapport aux chiens non traités ($14,84 \pm 14,57$ vs $29,05 \pm 14,04$ cellules luxol positives/mm² ; $p=0,0389$, Student's t test). La comparaison de ces résultats à ceux obtenus chez les chiens traités avec l'AAVr 5/5 ne montre pas de différence significative ($p=0,1714$) bien que la correction semble être moins nette chez les chiens traités par l'AAVr 2/5 ($14,84 \pm 14,57$ pour l'AAVr 2/5 vs $3,38 \pm 3,78$ pour l'AAVr 5/5). Une différence importante entre ces deux groupes de chiens est l'âge d'injection du vecteur AAV ($7,54 \pm 2,28$ mois pour l'AAVr 2/5 vs $4,03 \pm 0,62$ mois pour l'AAVr 5/5). A distance du site d'injection, la surcharge neuronale est corrigée pour les chiens MPS I traités par l'AAVr 2/5. Il est à noter que l'efficacité de la correction à distance est d'autant meilleure que l'animal est injecté jeune. Ces résultats suggèrent que l'âge est un facteur important à prendre en compte pour l'établissement de l'essai clinique. Il semblerait que certaines lésions soient irréversibles si le traitement a lieu trop tardivement.

Nous avons également étudié chez ces chiens la tolérance à long terme et l'efficacité de l'immunosuppression. L'étude neuropathologique des chiens MPS I traités avec l'AAVr 2/5 sous immunosuppression forte durant une période de 0,7 à 6 mois, n'a pas montré de réaction inflammatoire. En revanche le chien D21 traité avec l'AAVr 2/5 pendant 3,5 mois et faiblement immunosupprimé (MMF seul) présente une réaction inflammatoire sévère caractérisée par des foyers de nécrose de liquéfaction étendus correspondant probablement aux sites d'injections, des manchons périvasculaires lymphoplasmocytaires nombreux et des nodules de neuronophagie.

Les résultats obtenus avec les chiens injectés avec le vecteur AAVr 2/5 confirment les résultats obtenus avec l'AAVr 5/5, à savoir une distribution du vecteur et de l'enzyme sur la quasi-totalité du cerveau et la nécessité de mettre en place un traitement immunosuppresseur fort. Ces résultats soulèvent également la question de l'âge auquel commencer le traitement pour les patients MPS I. Après la confirmation de ces résultats, la mise au point de la production du vecteur AAV2/5-Idua en condition GMP est en cours. Des quantités élevées de vecteurs sont nécessaires. Une production des AAV dans un système baculovirus/sf9 s'est avérée être une solution plus adaptée que le système de production en cellules 293 pour obtenir les spécifications requises.

Des études préliminaires de sécurité vont être effectuées chez le rat afin de permettre l'établissement des protocoles réglementaires de toxicité et de biodistribution.

L'essai clinique envisagé pour cette maladie devrait être réalisé chez des patients en échec de greffe. Le nombre de patients en échec de greffe susceptibles d'être inclus n'est pas connu à ce jour. Par la suite, le traitement par thérapie génique pourrait être associée à la greffe de moelle osseuse.

Troisième article

Transduction Pattern in Central and Peripheral Nervous System after rAAV2/2, rAAV2/1 and rAAV2/5 Intracerebral Injection in Nonhuman Primate

Carine Ciron, Françoise Roux, Arnaud Cressant, Sylvie Raoul, Yan Chérel, Philippe Hantraye, Bertrand Schwartz, Jean-Michel Heard, Philippe Moullier, Marc Tardieu, Marie-Anne Colle.

Introduction et conclusion en cours d'écriture

Materials et Methods

Adenoassociated Virus Vector Construction and Production

The AAV recombinant genome contains the coding sequence of the human Idua gene under the control of the mouse phosphoglycerate kinase promoter, the posttranscriptional regulatory element of woodchuck hepatitis virus, and the bovine hormone gene polyadenylation unit, flanked by AAV2 ITRs. This expression cassette is encapsidated in an AAV-2, -1 and -5 shell. The expression vector was cotransfected into 293 cells with pDG to produce rAAV2/2. To produce rAAV2/1 and rAAV2/5, pDG was substituted with PDF1 and PDF5 respectively. Vectors were purified by using two successive CsCl gradients. Vector titers were determined by dot-blot assay and the titers were $1,4 \times 10^{11}$, $1,6 \times 10^{11}$, and $1,8 \times 10^{11}$ vg/ml for rAAV2/1, rAAV2/2, and rAAV2/5, respectively. They were considered to be equal.

Intracerebral injections of AAV vectors

Six macaques (*Macacca fascicularis*) were purchased from BIOPrim, Baziège, France. Experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the National Veterinary School of Nantes and the University of Nantes, France, and were performed by authorized investigators. Anesthesia consisted of isoflurane inhalation (induction 5% vol/vol then 1% vol/vol) and morphine injection (0,1 mg/kg). Mac 2-1 and Mac 2-2, have received one injection of the AAV2/2-hIDUA vector One track but 2 deposits: 1 in the putamen, and 1 in the white matter (2 x 50 µl; total dosage, $1,4 \times 10^{10}$ vector genomes). Mac 1-1 and Mac 1-2, have received one injection of the AAV2/1-hIDUA vector at the same locations (2 x 50 µl; total dosage, $1,6 \times 10^{10}$ vector genomes) and Mac 5-1 and Mac 5-2 received one injection of the AAV2/5-hIdua vector similarly (2 x 50 µl; total dosage, $1,8 \times 10^{10}$ vector genomes). To localize the injection site prior to the injection, MRI images were produced for all macaques with the exception of Mac 52 in CEA, Orsay, Paris. Neutralization assays indicated that Mac 2-1 and Mac 2-2, Mac 1-1 and Mac 1-2, Mac 5-1 and Mac 5-2, did not have neutralizing antibodies against rAAV2, rAAV1 and rAAV5 particles respectively. All macaques received an immunosuppressive treatment consisting of mycophenolate mofetil (MMF; 20 mg/kg/day). Immunosuppression was started 2 weeks before vector injections

Tissue processing

Animals were euthanized 15 weeks post-injection. Anesthetized animals were perfused with 150 ml phosphate-buffered saline and 700 ml 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline.

Brain hemispheres were immediately cut into 4 mm-thick coronal slabs (n= 17-19). In all macaques, uneven-numbered slabs were used for vector genome detection, whereas even-numbered slabs were used for histological studies. Slabs used for genome detection were divided in dorsal lateral, dorsal medial, ventral lateral and ventral medial quarters.

After euthanasia, we have removed the spinal cord and separated the left and right side. Then we have separated the dorsal and ventral part.

Others tissues, that were collected, included cranial and peripheral nerves, neuromuscular junction, liver, testicles... Each sample was collected using disposable surgery instruments and material to avoid any cross-contamination between tissues.

Mononuclear cells were isolated using the Ficoll protocol (Eurobio).

Genomic DNA was extracted by lysis in a 50 mM Tris (pH 8), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) solution containing 10 mg/ml proteinase K (Eurobio). After overnight digestion at 55°C, the DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated, and resuspended in 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8).

Quantitative Polymerase Chain Reaction

Vector genomes copy numbers were determined by Q-PCR. Sequences from the transgene (WPRE) and the endogeneous gene (Erythropoietin gene of macaque) were amplified using the SyberGreen Q-PCR method. Reference curves were established by determining cycle threshold values for the amplification of serial dilutions (5, 1, 0.2, 0.04, 0.008, 0.0016, 0.00032 pg) of plasmid DNA containing the Erythropoietin complementary DNA (32.3 to 5.4 x 10⁵ copies, forward primer: 5'-GCTCCACTCCGAACCATCAC-3'; reverse primer: 5'-TCATCTGTCCCCTCTCCTGC-3') or the WPRE complementary DNA (40.7 to 6.3 x 10⁵ copies, forward primer: 5'-AGGTGGCAACACAGGCCGA-3'; reverse primer: 5'-TTGGGCACTGACAATTCCG-3'). The same sequences were amplified simultaneously from serial dilutions of macaques brain and spinal cord genomic DNA. Vectors genome copy numbers were calculated for every cycle threshold according to plasmid DNA reference curves, and mean values were expressed for 2N genomes according to the macaque erythropoietin gene copy number measured in the same sample. Amplification parameters for the erythropoietin gene were 10 minutes at 95°C and 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 69°C for 6 seconds and 72°C for 6 seconds using the LightCycler 2.0 PCR apparatus (Roche Applied Biosystems, France). For the WPRE sequence of the transgene, amplification were 10 minutes at 95°C and 40 cycles at 95°C for 10 seconds, 60°C for 6 seconds and 72°C for 6 seconds. Efficacy of the Q-PCR is the same for the 2 couples of primers. The assay sensitivity threshold was accordingly fixed to 0.01 copy per diploid genome.

Analysis of rAAV DNA and infectious particles in body fluids

Serum and CSF were repeatedly collected as indicated.

Vector genome in biological fluids was detected by PCR analysis, and the presence of infectious rAAV particles was quantitated using the mRCA.

For PCR analysis, rAAV DNA was extracted from 140 µl of samples using the Qiaamp Viral RNA minikit (Qiagen, SA, France). The extraction was then analysed by PCR. The primers were located in the WPRE sequence. Forward primer: 5'-CTATTGCTTCCCGTATGGCT-3', reverse primer: 5'-CTTCCCCGACAACACCAC-3'. PCR-amplified vector sequences yielded a 290 bp fragment. After initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles were run at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s using *Taq* DNA polymerase (Promega) in a Perkin-Elmer thermocycler (PE, USA). Amplified products were analysed by agarose gel electrophoresis followed by a transfer under alkaline conditions to Hybond N⁺ membrane (Amersham). The membrane was hybridized to a 290 bp fluorescein-labeled WPRE probe (Amersham, Gene Images random prime labelling module) and incubated overnight at 65°C. The following day the membrane was processed according to the manufacturer's protocol (Amersham, Gene Images CDP-star detection module) and exposed to autoradiography film.

To detect rAAV infectious particles, 200 µl of each biological fluid sample was added on 10⁶ subconfluent HeLaRC32 cells for 2 hours. Two days later, cells were harvested and treated as described. Replication centers were revealed using the 848 bp hIdua probe.

Analysis of PBMC and Tissues

PCR analysis was performed using 750 ng and 75 ng DNA as described above. A control reaction was performed to detect the actin gene using two primers :

- forward primer: 5'TGACGGGGTCACCCACACTGTG-3'
- reverse primer: 5'CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'

which amplified a 600 Bp fragment.

Histology

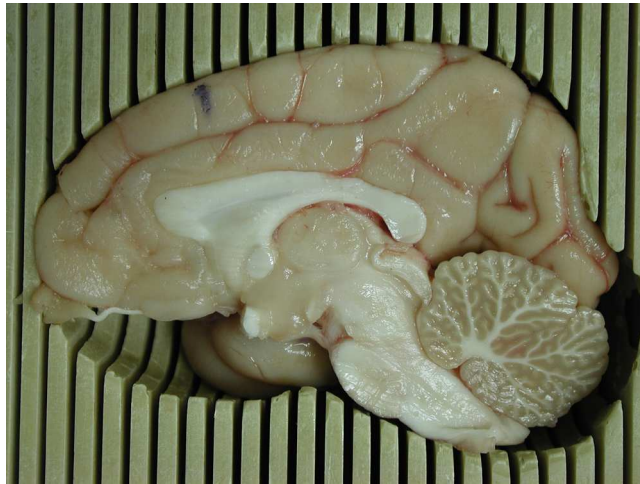
Inflammation was assessed on even-numbered slabs that had been fixed in 4% PFA, embedded in paraffin and cut into 4 µm sections. Slabs were stained with hematein end eosin.

Behavioural testing

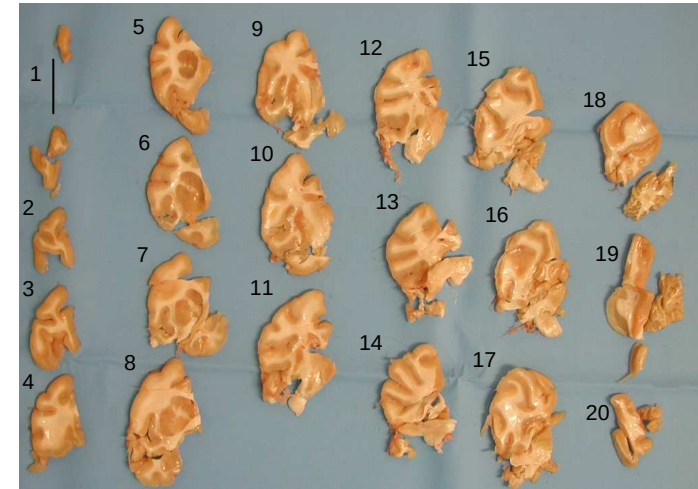
Testing was performed one time before injection and at 2 months after intracerebral injection for all macaques. The comportemental test consisted of 4 parts: study of the global activity, motricity, attention and ocular activity. Each part was performed during 15 min.

Right hemisphere

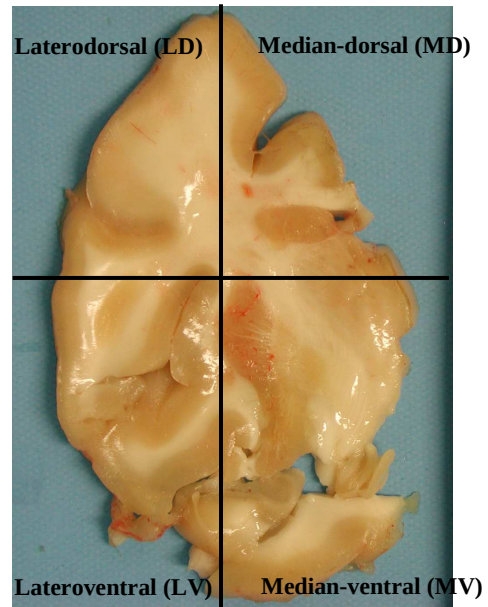
A



B



C



AAV2

Mac 2-1

LEFT

RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0	0	0	0	0,12	0,12	0
3	0	0,06	0	0	0	0,12	0	0
5	0,05	0,10	0	0,10	0	0	0	0,97
7	0	0	0	0,15	3,96	0	0,98	1,93
9	2,11	0	0	0	0,83	4,24	0,20	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0

Left:16,70%

Right:27,80%

Mac 2-2

LEFT

RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0,07	0,07	0	0,14	0	0	0,14
3	0,06	0	0,06	0,07	0,11	0,42	0,41	0,69
5	0,21	0	0,09	0	0	7,87	14,3	0,20
7	0,25	0	0,34	0,66	2,03	0,20	0,21	2,74
9	0	0	0	0,45	0	0,40	0,75	0,26
11	0	0	0	0	0	0	0	0,35
13	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0

Left:30,50%

Right:41,70%

AAV1

Mac 1-1

LEFT

RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0,14	0,21
7	0	0	0	0,89	0,5	24,3	161	4,2
9	0	0	0	0,73	0	185	0,83	0,26
11	0	0	0,29	0	0,83	76,9	31,9	0,14
13	0	0	0	0	0	0,71	0,71	2,97
15	0	0	0	0	0	0	2,05	0,59
17	0	0	0	0	0	0	0	0,39

Left:8,30%

Right:52,80%

Mac 1-2

LEFT

RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0	0,05	0	0	0	0,08	0
3	0	0	0	0,11	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0,22	1,98
7	0	0	0	0	0,4	8,63	0,29	0,31
9	0	0	0	0	0,26	0,48	24,2	0,26
11	0	0	0,22	0	0	4,65	0	0,22
13	0	0,12	0	0	0	0	0	0
15	0,09	0	0,12	0,04	0,09	0	0,08	0,05
17	0	0,06	0	0	0,1	0	0	0,09
19	0	0	0	0	NA	NA	NA	NA

Left:20%

Right:50%

AAV5

Mac 5-1

LEFT

RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0	0	0	0,24	0,04	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0,04	0,03	0	0
9	0	0	0	0	0,20	0,97	0,11	0,09
11	0	0	0	0	0,08	0,10	0,08	0
13	0	0	0,06	0	0	0	0,12	0
15	0,05	0	0,04	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0

Left:8,30%

Right:33,3%

Mac 5-2

LEFT

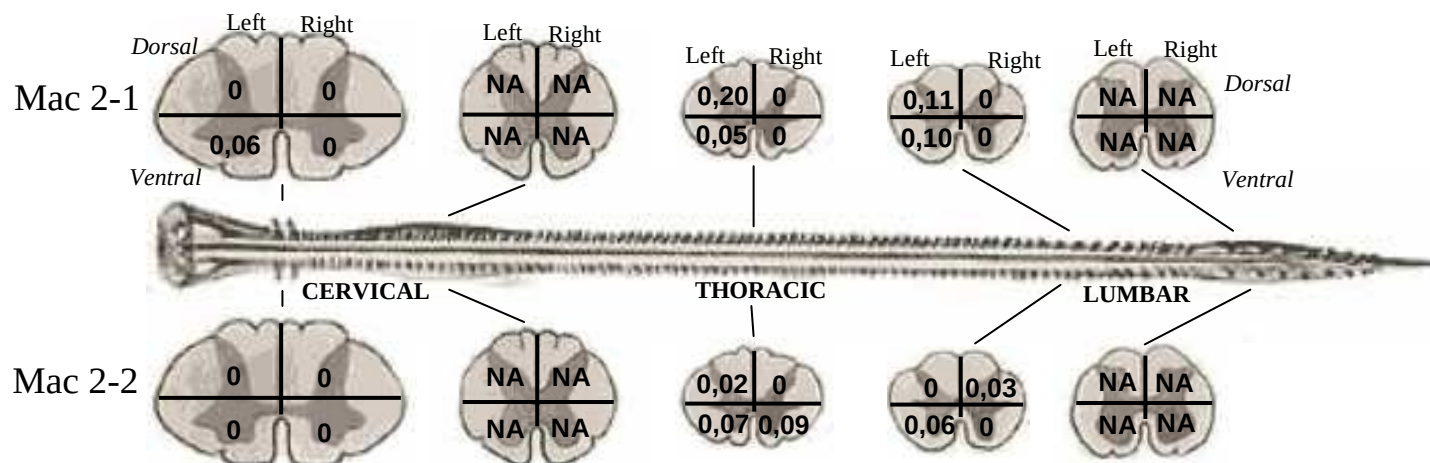
RIGHT

	LD	LV	MV	MD	MD	MV	LV	LD
1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0,85
9	0	0,09	0	0	1,92	0,70	0,25	1,20
11	0,04	0,06	0	0,06	0,41	1,65	3,12	0,32
13	0	0	0,18	0,06	0	0,20	1,35	0,17
15	0	0	0	0	0	0	0,04	0,08
17	0	0	0	0	0,06	0	0	0,08
19	NA	NA	NA	NA	0,04	0,10	0	0

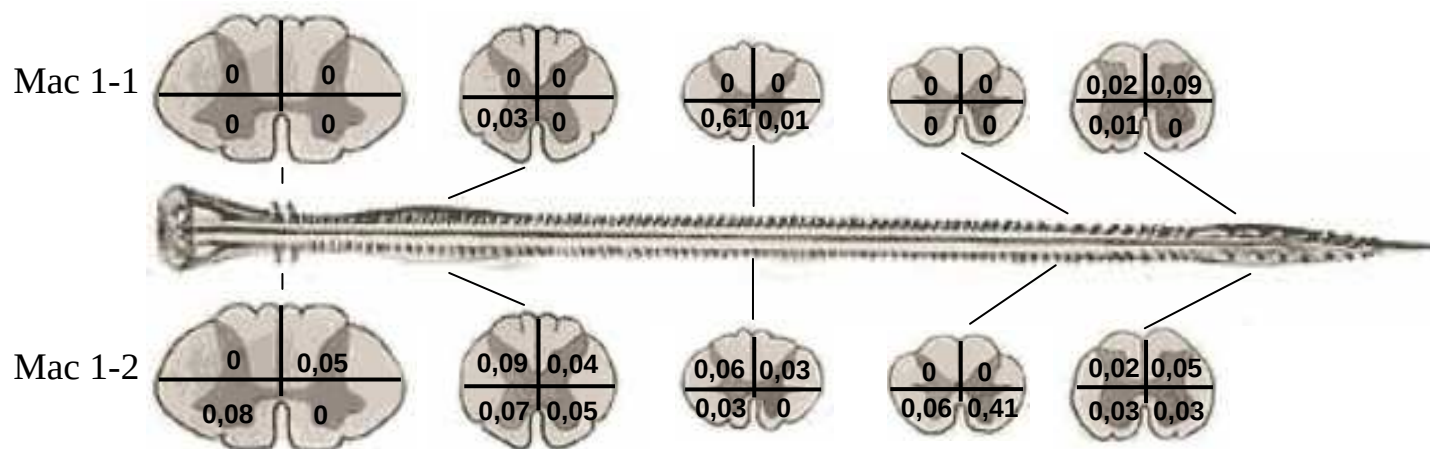
Left:16,70%

Right:45%

AAV2



AAV1



AAV5

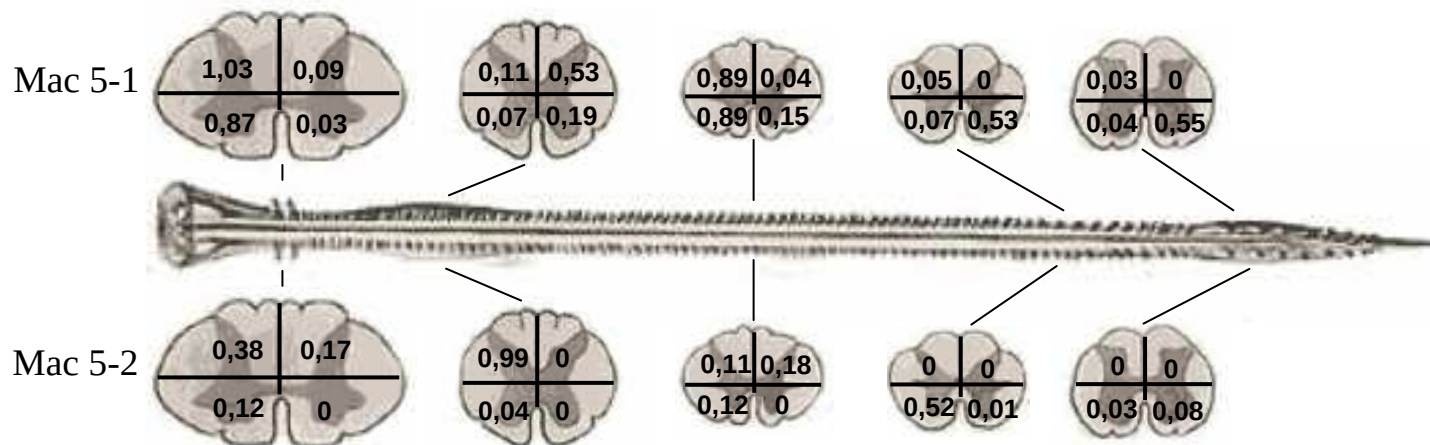


Fig 1 : Methodology

All animals were euthanized and immediately fixed with PFA4%. Brains were removed and the hemispheres were sagittally separated (A). Each hemisphere was cut in serial slices using a brain matrice(B). Correspondence with main structures of the brain is approximately as follows: putamen/pallidum, slices 5-9; caudate nucleus, slices 5-11; thalamus, slices 9-11; Hippocampus, slice 11; midbrain, slice 13; cerebellum, slices 15-17. (C) Each slice was cut in 4 parts and described as follow: laterodorsal, median-dorsal, median-ventral and lateroventral.

Fig 2 : Transduction patterns in the brain.

The large boxes are schematic representations of monkey brain hemispheres. Coronal slab numbers (increasing from rostral to caudal) are indicated on the left. Small boxes correspond to laterodorsal (LD), lateroventral (LV), median-dorsal (MD), and median-ventral (MV) quarters of each slab. Vector genome copy numbers were determined by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). Zero states for values less than 0,01 copy per cell. The injection site corresponds to slice 7 in the right hemisphere for all macaques. Color boxes indicate positive samples. Yellow boxes indicate samples with number of vector genome copy between 0,01 and 0,1 copy per cell, orange boxes indicate samples with number of vector genome copy between 0,1 and 1 copy per cell, and brown boxes indicate samples with more than 1 vector genome copy per cell. The proportions of samples in which vector genome was detected in each hemisphere are indicated for each macaque on the right.

Fig 3: Transduction pattern in spinal cord.

After removing the spinal cord, the left and right side as well as the ventral and dorsal part were separated as described. We analysed coronal slices of the main part of the spinal cord.

Vector genome copy numbers were determined by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). Zero states for values less than 0,01 copy per cell.

TABLE 1: Detection of rAAV vector sequences by PCR in cranial and peripheral nerves

Animals	Cranial nerves																
	O		OC	ONJ		T						Fp		Fd		V	
						T.b		Oph.b		Ma.b							
	L	R		L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Mac 1-1	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mac 1-2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mac 2-1	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	n.d.	n.d.
Mac 2-2	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Mac 5-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Mac 5-2	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

O, optical nerve; OC, optical chiasma, ONJ; ocular neuromuscular junction, T, trigeminal nerve; T.b, trigeminal branch; Oph.b, ophthalmic branch; Ma.b, mandibular branch; Fp, proximal part of facial nerve; Fd, distal part of facial nerve; V, vagus nerve; L, left; R, right; (+), positive; (-), negative; n.d., not done.

Animals	Peripheral nerves																			
	BPl		PVG		STG		SLG		LPl		Sp		Sd		Tp		Td		TNJ	
	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Mac 1-1	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	n.d.	n.d.
Mac 1-2	+	-	n.d.	n.d.	-	+	n.d.	n.d.	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	n.d.
Mac 2-1	n.d.	n.d.	+	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Mac 2-2	-	-	n.d.	n.d.	-	+	-	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Mac 5-1	+	-	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Mac 5-2	+	+	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

BPl, brachial plexus; PVG, paravertebral ganglions; STG, spinal thoracic ganglions; SLG, spinal lumbar ganglions; Lpl, lumbar plexus; Sp, proximal part of spinal nerve; Sd, distal part of spinal nerve; Tp, proximal part of tibial nerve; Td, distal part of tibial nerve; TNJ, tibial neuromuscular junction; L, left; R, right; (+), positive; (-), negative; n.d., not done.

TABLE 2: Detection of rAAV vector sequences by PCR in serum, CSF and PBMC

Animals	Time post-injection														
	Serum								CSF				PBMC		
	1h	1d	3d	4d	7d	10d	14d	euth	1h	7d	14d	euth	7d	3w	euth
Mac 1-1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Mac 1-2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Mac 2-1	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Mac 2-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Mac 5-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Mac 5-2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

CSF, cerebrospinal fluid; PBMC, mononuclear cells of peripheral blood;

h, hour; d, day; w, week; euth, day of euthanasia;

(+) , positive; (-), negative.

TABLE 3 : Detection of infectious AAV by RCA in serum and CSF

Animals	Injected dose (vg)	Serum				CSF	
		rAAV infectious particles/ml				rAAV infectious particles/ml	
		1h p.i	1 day p.i	3 days p.i	4 days p.i	1 h p.i	7 days p.i
Mac 1-1	1.6×10^{10}	0	1×10^4	5×10^2	0	NA	0
Mac 1-2	1.6×10^{10}	0	5×10^2	0	0	NA	0
Mac 2-1	1.4×10^{10}	1×10^3	5×10^2	0	0	$1,5 \times 10^3$	0
Mac 2-2	1.4×10^{10}	0	4×10^3	0	0	2×10^3	0
Mac 5-1	1.8×10^{10}	0	0	0	0	0	0
Mac 5-2	1.8×10^{10}	0	0	0	0	0	0

CSF, cerebrospinal fluid; p.i, post rAAV injection; NA, not available.

TABLE 4: Detection of rAAV vector sequences by PCR in tissues

Animals	Tissues				
	Li	G		LN	
		L	R	L	R
Mac 1-1	+	-	-	-	-
Mac 1-2	+	-	-	-	-
Mac 2-1	-	-	-	-	-
Mac 2-2	-	-	-	-	-
Mac 5-1	-	-	-	-	-
Mac 5-2	-	-	-	-	-

Li, liver; G, gonads; LN, lymph nodes;
L, left; R, right; (+), positive; (-), negative.

Results :

rAAV transduction pattern in the brain

Tissue samples for quantitative PCR analysis were prepared as indicated in Fig 1. The injection site corresponds for all macaques to the slice 7.

The results of the Q-PCR analysis are shown in Figure 2. Vectors genomes were detected by Q-PCR in 27,8 to 41,7 % of the injected hemisphere for Mac 2-1 and Mac 2-2, in 50 to 52,8% of the injected hemisphere for Mac 1-1 and Mac 1-2 and in 33,3 to 45% of the injected hemisphere for Mac 5-1 and Mac 5-2. Concerning the controlateral hemisphere, vectors genomes were detected in 16,7 to 30,5% of the hemisphere for Mac 2-1 and Mac 2-2, in 8,30 to 20% of the hemisphere for Mac 1-1 and Mac 1-2 and in 8,3 to 16,7% of the hemisphere for Mac 5-1 and Mac 5-2. The number of positive samples is equal among macaques (Fig 2). Peak values (in brown) correspond to areas surrounding the injection site. The number of copies decreases rapidly with growing distance to the injection site.

Peak values varie between 2 and 14,3 copies per cell for the macaques injected with rAAV2, between 2 and 185 copies per cell for the macaques injected with rAAV1, and between 1 and 3,1 copies per cell for macaques injected with rAAV5. The transduction efficiency is much greater with rAAV1 compared to rAAV2 and rAAV5. Surprisingly, the transduction efficiency of rAAV5 seems to be inferior compared to rAAV2. Others Even if all macaques are injected at the same location, the pattern of transduction seems to be different for each serotype. rAAV2 transduces the frontal part of the injected hemisphere, rAAV5 the caudal part while rAAV1, transduces more homogeneously the entire hemisphere.

rAAV transduction pattern in the spinal cord

Vectors genomes were detected by Q-PCR in the spinal cord of all macaques (Fig 3). The number of copies varies between 0 and 0,2 copy per cell for Mac 2-1 and Mac 2-2, between 0 and 0,6 copy per cell for Mac 1-1 and Mac 1-2, and between 0 and 1 copy per cell for Mac 5-1 and Mac 5-2. Higher numbers of copies are observed in the controlateral left side of the spinal cord while a small amount of vector genome is detected in the ipsilateral right side. One hypothesis is that the vector spread from the injection site by axonal transport. The discrepancies of the rAAV transduction pattern observed between the left and the right side consolidate this hypothesis. Vector genomes are mainly detected in the controlateral left side of the spinal cord because of the decussation of axons. However axonal decussation is not complete, therefore a small amount of vector genomes is detected in the ipsilateral right side of the spinal cord.

A higher and more homogeneous transduction efficiency is observed with rAAV5 compared to rAAV2 and rAAV1. The highest efficiency of transduction is observed for rAAV5 in the upper part of the spinal cord (1 copy per cell).

Analysis of rAAV spread in cranial and peripheral nerves

The presence of rAAV vector genome was assessed by PCR and southern Blot to detect the WPRE sequence in nerves (cranial and peripheral) listed in table 1. Vector genomes were detected in the majority of the analysed cranial nerves and in nerves at distance, like the tibial nerve for all macaques.

rAAV dissemination in fluids and PBMC

The presence of rAAV vector genome was assessed by PCR and southern Blot to detect the WPRE sequence in serum and CSF harvested from 1 hour post injection until euthanasia (Table 2). The sensitivity of the PCR assay and Southern blot was first evaluated by incubating a known number of copies of a plasmid carrying WPRE with biological fluids. After hybridization with a WPRE probe, we detected 1 copy in serum and 41 copies in CSF. PCR sensitivity is lower in CSF. PCR performed in serum of all animals indicated that viral DNA could be detected as soon as 1 hour after rAAV injection (with the exception of Mac 2-1, and up to 14 days for Mac 5-1. In CSF, we detected vector genomes as soon as 1 hour post-injection (except for Mac 2-2) and until euthanasia for 2 macaques: Mac 1-2 and Mac 5-2.

The presence of infectious particles was quantitated in the same samples by a replication center assay (RCA) and is shown in table 3. rAAV infectious particles were detected in serum of Mac 1-1, Mac 1-2, Mac 2-1 and Mac 2-2. Infectious particles were never detected in the serum of these animals taken after the third day post injection for Mac 1-2, Mac 2-1 and Mac 2-2 and taken after the fourth day for Mac 1-1. We have never detected infectious particles in the serum of Mac 5-1 and Mac 5-2.

In CSF, infectious particles were only detected for Mac 2-1 and Mac 2-2 at 1 hour post-injection.

Because infectious rAAV particles were detected in the serum, we verified the presence of rAAV sequences could be found in PBMC at several time points. This was done by PCR analysis of rAAV sequence using genomic DNA from Ficoll-purified mononuclear cells. No positive signal was observed in all macaques.

Analysis of rAAV spread to distant organs

We analysed the spread of rAAV to distant organs (Liver, testicles and lymph nodes). rAAV sequences were searched by PCR analysis and southern blot. Table 4 summarizes the complete results.

Vector genomes were only detected in the liver of Mac 1-1 and Mac 1-2. The other tissues, lymph nodes and the gonads, were consistently negative in all macaques.

3 Résultats et discussion du troisième article :

3.1 Objectifs :

L'AAVr 2 est, jusqu'à présent, le sérotype le plus utilisé en transfert de gène dans le SNC. Il transduit principalement les neurones (McCown *et al.*, 1996; Peel *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Mandel *et al.*, 1998). Il peut également transduire avec une efficacité plus faible, les astrocytes, les cellules épendymaires et les cellules microgliales (Kaplitt *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2000; Cucchiari *et al.*, 2003). La forte prévalence d'anticorps neutralisants dirigés contre l'AAV2 sauvage dans la population humaine (Chirmule *et al.*, 1999a; Mastakov *et al.*, 2002b) peut limiter son utilisation pour les essais cliniques. D'autres sérotypes sont capables de transduire les cellules du SNC avec une efficacité plus forte et un tropisme plus large que le sérotype 2 (Alisky *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Cucchiari *et al.*, 2003; Passini *et al.*, 2003; Vite *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004). Les sérotypes caractérisés récemment comme l'AAVr 7, AAVr 8, AAVr 9 et AAVr 10 (à nouveau nous ne tenons compte que des capsides, puisque les études sont effectuées avec des vecteurs hybrides présentant toujours les ITR de l'AAV2) apparaissent prometteur pour un transfert de gène efficace dans le SNC (Cearley and Wolfe, 2006; Harding *et al.*, 2006). Toutefois les sérotypes 1 et 5 sont les mieux décrits. Leur efficacité de transduction et leur tropisme ont été comparés à celui de l'AAVr 2 dans le SNC de rongeurs principalement (Davidson *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 2004). Ces deux sérotypes montrent une meilleure efficacité de transduction et des niveaux d'expression du transgène plus forts que l'AAVr 2 dans le striatum, l'hippocampe, le globus pallidus, la substance noire, la moelle épinière et le cervelet (Alisky *et al.*, 2000; Davidson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004). Ils sont également capables de transduire des astrocytes à proximité et à distance du site d'injection (Davidson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). L'efficacité de transduction de l'AAVr 1 est 13 à 35 fois plus forte que l'AAV2 dans le striatum de souris (Wang *et al.*, 2003). Dans le cerveau de chat, l'AAVr 1 transduit la substance grise et la substance blanche, notamment les oligodendrocytes (Vite *et al.*, 2003). Aucune transduction n'est notée avec l'AAV5 dans le cerveau de chat, alors qu'il transduit efficacement le SNC canin (Ciron *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent la possibilité d'une variabilité entre les espèces. Nous avons donc voulu comparer le profil de transduction des capsides d'AAVr 2, 1 et 5 dans le SNC de primates. De plus, la dissémination du vecteur étant un facteur à prendre en compte lors de la mise en place

d'un essai clinique, nous avons également étudié la biodistribution de ces sérotypes dans le SNP, les fluides et les organes.

3.2 Stratégie expérimentale :

Dans cette étude nous avons utilisé des vecteurs pseudotypés. Tous portent une cassette d'expression identique encadrée par les ITR de l'AAV2. Seule la capside peut interférer sur l'efficacité de transduction et le tropisme de ces différents sérotypes. La cassette d'expression est constituée du promoteur PGK murin, de l'ADNc de l'Idua humaine, de la séquence WPRE, et du signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine. Durant cette étude six macaques ont été injectés intracérébralement, 2 par sérotype. Nous avons produit les stocks d'AAVr 2/1, AAVr 2/2 et AAVr 2/5 avec les mêmes titres (approximativement $1,6 \cdot 10^{11}$ p/ml). Chaque macaque a reçu 100 μ l des préparations d'AAVr en 2 dépôts dans l'hémisphère droit. Le dépôt profond ciblait le putamen et le dépôt superficiel la substance blanche, avec une vitesse d'administration de 4 μ l/min et 3 μ l/min respectivement. Une IRM a été effectuée sur chaque macaque afin d'établir les coordonnées stéréotaxiques pour l'injection. Les macaques n'ont reçu qu'une seule injection dans un seul hémisphère, car l'objectif dans cette étude n'était pas d'obtenir la diffusion du vecteur la plus large possible dans le SNC, mais de comparer le profil de transduction des sérotypes 1, 2 et 5 après injection dans un même site. Tous les macaques ont reçu un traitement immunosuppresseur modéré, basé sur la prise de mycophénolate mofétil, afin d'éviter une réponse immunitaire dirigée contre l'Idua humaine. Le traitement immunosuppresseur a débuté 15 jours avant l'injection. La sérologie de chaque macaque a été établie. Aucun ne présentait d'anticorps neutralisants dirigés contre la capside du sérotype injecté.

Les macaques ont été euthanasiés à 15 semaines post-injection. Les hémisphères ainsi que le cervelet ont été séparés sagittalement. Des coupes coronales sériées de 4 mm ont été effectuées sur chacun d'eux. Chaque tranche impaire a été divisée en 4 fragments et chaque fragment a été analysé par PCR quantitative. Une cartographie de diffusion du transgène a ainsi été établie. Les tranches paires sont destinées aux études histologiques. La distribution du vecteur a également été analysée dans la moelle épinière, le SNP, le foie, les testicules, les fluides (sérum, et LCR) et les PBMC. Grossièrement le putamen et le pallidum correspondent

aux tranches 5 à 9, le noyau caudé aux tranches 5 à 11, le thalamus aux tranches 9 à 11, l'hippocampe à la tranche 11 et cervelet aux tranches 15 à 17.

3.3 Profil de transduction des différents sérotypes dans le SNC :

Le site d'injection correspond à la tranche 7 pour tous les macaques. Pour l'AAVr 2/2 le transgène est détecté par PCR quantitative sur 27,8 à 41,7% de l'hémisphère injecté, pour l'AAVr 2/1 sur 50 à 52,8% de l'hémisphère injecté et pour l'AAVr 2/5 sur 33,3 à 45% de l'hémisphère injecté. Pour tous les macaques, le transgène est également détecté dans l'hémisphère controlatéral, avec un nombre de copies plus faible que dans l'hémisphère injecté. Bien que volume cérébral transduit soit équivalent pour tous les sérotypes, le profil de transduction semble lui être différent. Tous les macaques ont été injecté dans un même site, et pourtant l'AAVr 2/2 transduit la partie frontale de l'hémisphère injecté, l'AAVr 2/5 la partie caudale et l'AAVr 2/1 transduit l'hémisphère entier de manière plus homogène. La distribution des récepteurs spécifiques des sérotypes d'AAV est vraisemblablement différente selon les types cellulaires et les régions du système nerveux central. Ces récepteurs peuvent directement influencer la diffusion des particules virales à travers l'espace extracellulaire. Les protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) (Summerford and Samulski, 1998), l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (Summerford *et al.*, 1999), le facteur de croissance des fibroblastes (Qing *et al.*, 1999) ont été identifiés comme des récepteurs importants de l'AAV 2. Les récepteurs de l'AAV5 sont également identifiés comme étant l'acide sialique N-lié (Kaludov *et al.*, 2001) et le récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) (Di Pasquale *et al.*, 2003). Pour le moment les récepteurs de l'AAV1 ne sont pas connus. L' HSPG et le PDGFR sont fortement exprimés à la surface des neurones (Oumesmar *et al.*, 1997; Burger *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2005). Du fait de la prépondérance de leurs récepteurs, les particules d'AAV2 et d'AAV5 pourraient se lier rapidement à leur récepteurs et donc limiter ainsi leur diffusion dans le parenchyme. Les profils de transduction différents peuvent également s'expliquer par une affinité différente des sérotypes pour les transports axonaux, antérograde ou rétrograde. Le putamen reçoit un certain nombre de voies afférentes provenant de la substance noire (voies nigro-striées), du thalamus (voies thalamo-striées) et de la quasi-totalité du cortex (voies cortico-striées). Il est donc possible d'imaginer un transport rétrograde vers ces différentes régions si les terminaisons axonales correspondantes sont transduites. Un transport rétrograde du striatum vers la substance noire a été mis en évidence pour l'AAVr 1 et l'AAVr 5 dans le SNC de rats (Burger *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2004). Le putamen projette également des

axones sur le globus pallidus qui interagit également avec le thalamus. Un transport antérograde du striatum vers le globus pallidus a été montré chez le rat avec l'AAVr 2 (Hadaczek *et al.*, 2004). En fonction de la zone ciblée dans le putamen, un transport rétrograde ou antérograde pourra avoir lieu, contribuant à une diffusion plus large du vecteur.

Un nombre élevé de copies de transgène est obtenu pour tous les sérotypes dans les tranches encadrant le site d'injection. Ce nombre de copies diminue rapidement à distance. L'efficacité de transduction de l'AAVr 2/1 est largement supérieure à celle de l'AAVr 2/2 et l'AAVr 2/5. La transduction par l'AAVr 2/1 est 10 fois plus élevée que l'AAVr 2/2 au site d'injection. Ces résultats sont comparables à ce qui est observé dans le SNC de rats (Wang *et al.*, 2003). Vraisemblablement le nombre plus important de copies de transgène détecté peut s'expliquer par un transport au noyau et une décapsidation plus efficace pour l'AAV1 que pour les autres sérotypes. De manière surprenante, l'AAVr 2/5 semble permettre un transfert de gène moins efficace que l'AAVr 2/2 dans le SNC de primates. Ces résultats restent cependant à confirmer par l'injection d'autres macaques. Il semblerait que l'efficacité de transduction de l'AAVr 5 dans le SNC soit plus variable selon les espèces que pour les autres sérotypes. En effet l'AAVr 5 permet un transfert de gène plus efficace que l'AAV2 dans le SNC de rongeurs et de chiens (Davidson *et al.*, 2000; Burger *et al.*, 2004; Desmaris *et al.*, 2004; Ciron *et al.*, 2006), mais aucune transduction n'est rapportée après injection intracérébrale chez le chat (Vite *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite analysé la moelle épinière de tous les macaques à différents niveaux : la moelle épinière cervicale, l'intumescence cervicale, la moelle épinière thoracique, la moelle épinière lombaire et l'intumescence lombaire. Nous avons séparé la partie gauche et droite de la moelle, puis séparée la partie dorsale et ventrale. Le transgène a été détecté dans la moelle épinière quelque soit le sérotype injecté. Cependant le nombre de copies de transgène par cellule est relativement faible pour l'AAVr 2/2 et l'AAVr 2/1 : de 0 à 0,2 et de 0 à 0,6 copie. Avec l'AAVr 2/5, le transgène est détecté dans la totalité de la moelle épinière, avec un nombre de copies de transgène par cellule assez élevé dans la moelle épinière cervicale, jusqu'à 1 copie par cellule. Le transport de l'AAV dans la moelle épinière se fait vraisemblablement par un transport antérograde à partir du cortex moteur en utilisant la voie corticospinale. La présence du vecteur dans le cortex moteur après injection dans le putamen peut s'expliquer de différentes manières. Il peut s'agir d'un mécanisme de diffusion passive, ou d'un transport rétrograde à partir du putamen, ou encore d'un transport antérograde *via* le

globus pallidus et le thalamus. Pour tous les sérotypes, la majorité du transgène a été détectée dans la partie gauche de la moelle épinière du fait de la décussation des axones. Cependant la décussation n'est pas complète ; ce qui explique que le vecteur soit aussi détecté en petite quantité dans la partie droite de la moelle. Ces résultats semblent conforter notre hypothèse d'un transport antérograde à partir du cortex moteur *via* la voie corticospinale. Toutefois nous ne pouvons pas exclure que le transgène détecté corresponde à une transduction des cellules épendymaires due à un transport des vecteurs dans le LCR. En effet ces 3 sérotypes peuvent transduire les cellules épendymaires plus ou moins efficacement (Davidson *et al.*, 2000; Passini *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Pour répondre à cette question nous sommes en train de mettre au point un protocole d'hybridation *in situ* en utilisant une sonde ARN spécifique de la séquence WPRE. Cette technique nous permettra de déterminer s'il y a transduction des motoneurones ou des cellules épendymaires bordant la moelle épinière. La transduction de motoneurones nous permettrait de confirmer l'hypothèse d'un transport transsynaptique du vecteur.

3.4 Distribution des différents sérotypes d'AAV dans le SNP, les organes et les fluides :

La présence du génome du vecteur AAVr a été déterminée par PCR suivie d'une hybridation avec une sonde spécifique de la séquence WPRE. Lors de l'euthanasie un certain nombre de nerfs crâniens et de nerfs périphériques ont été prélevés. Le transgène est détecté dans la majorité des nerfs crâniens et des nerfs à distance, comme le nerf tibial, quelque soit le sérotype injecté. Il n'y a pas de différences significatives entre eux. La présence du transgène dans les nerfs crâniens peut s'expliquer par la transduction des noyaux des nerfs crâniens dans le tronc cérébral par les différents sérotypes.

Nous avons également cherché la présence de séquence AAV dans le foie, les gonades et les nœuds lymphatiques. Le transgène a été détecté dans le foie des 2 macaques injectés avec l'AAV2/1. Connaître la biodistribution de chaque sérotype dans les différents organes à distance après une injection intracérébrale d'AAVr est une information majeure en vue de l'établissement d'un essai clinique. La dissémination d'un vecteur AAVr après une injection intracérébrale est très peu documentée. La biodistribution dans les fluides corporels et les organes à distance après injection intramusculaire, intrabronchique, intrahépatique, et sous

rétiniennne d'un AAVr est à la différence bien décrite chez le primate (Favre *et al.*, 2001; Provost *et al.*, 2005) (pour revue Tenenbaum *et al.*, 2003). Après ces différents types d'injection le vecteur est retrouvé faiblement et de façon transitoire dans différents fluides biologiques et dans les organes à distance. Après injection intramusculaire d'un AAV2, le génome du vecteur est retrouvé dans le foie et dans différents nœuds lymphatiques (Favre *et al.*, 2001). Un passage transitoire a été observé dans le sperme après administration dans l'artère hépatique. Cependant, les cellules germinales mobiles semblent être réfractaires à l'infection par un AAVr même si elles sont directement exposées aux particules virales, suggérant que le risque d'insertion d'un nouveau matériel génétique dans les lignées germinales est très faible ou inexistant (pour revue Tenenbaum *et al.*, 2003). Le risque d'une transmission du vecteur aux cellules des lignées germinales est à déterminer pour chaque sérotype, quelque soit le mode d'administration, avant de développer un essai clinique. Nous nous sommes également intéressés à la dissémination du vecteur dans le sérum et le LCR à différents temps post-injection. Par PCR suivie d'une hybridation avec une sonde WPRE, nous avons détecté le transgène dans le sérum et le LCR de tous les macaques. Le passage du vecteur dans ces deux fluides biologiques n'est pas surprenant. Il est lié à l'intervention chirurgicale. En effet l'injection intracérébrale implique le passage et une rupture des méninges et donc une possibilité de fuite du vecteur dans le LCR. Egalement l'injection nécessite l'incision des muscles entourant le crâne (très développé chez le macaque) avec un risque hémorragique pouvant entraîner un passage du vecteur dans la circulation sanguine. Nous avons ensuite quantifié dans les mêmes échantillons de fluides biologiques la présence de particules infectieuses par RCA (*replication center assay*). Des particules AAVr infectieuses sont détectées dans le sérum des macaques injectés avec l'AAVr 2/2 et avec l'AAVr 2/1. Nous n'avons pas détecté de particules infectieuses au-delà de 4 jours post-injection. Le pourcentage de la dose injectée circulant au pic (soit 1 jour post-injection) était de 0,17% pour Mac 2-1, 1,40% pour Mac 2-2, 1,90% pour Mac 1-1 et 0,08% pour Mac 1-2. Nous avons détecté des particules infectieuses seulement dans le LCR des deux macaques injectés avec l'AAVr 2/2 à 1h post-injection. L'absence de particules infectieuses dans le LCR des macaques injectés avec l'AAVr 2/1 et l'AAVr 2/5 semble confirmer notre hypothèse d'un transport antérograde des AAVr pour expliquer la présence du transgène dans la moelle épinière plutôt qu'une transduction des cellules épendymaires *via* le LCR. La circulation de particules infectieuses dans les fluides biologiques est une donnée importante pour le confinement des malades en clinique. Nous n'avons jamais détecté le transgène dans les PBMC chez tous les macaques.

3.5 Toxicologie :

Une dernière partie de cette étude était d'évaluer la tolérance à une injection stéréotaxique intracrânienne d'un vecteur AAV chez le primate. Pour cela des tests comportementaux ont été effectués sur les macaques avant et après l'injection. Aucun trouble comportemental n'a été noté à la suite de l'injection. Les analyses histologiques de coupe en paraffine n'ont révélé aucune inflammation secondaire à l'injection ou à l'expression du produit de transgène.

3.6 Conclusions et perspectives :

Une injection intracérébrale d'un vecteur AAV est bien tolérée dans le SNC de primates. Nos résultats semblent confirmer l'efficacité de transduction accrue de l'AAVr 1 par rapport à l'AAVr 2 et l'AAVr 5 dans le SNC (Passini *et al.*, 2003; Vite *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Burger *et al.*, 2004). A la différence le sérotype 5 semble transduire relativement faiblement les cellules du SNC de primates. Ces résultats sont à confirmer par une étude incluant un plus grand nombre de macaques. Les doses d'AAVr injectées dans notre étude sont faibles par rapport à ce qui est rapportée dans la littérature, 10 fois moins. Il est donc possible qu'avec une dose plus forte d'AAVr la transduction par l'AAVr 5 soit plus efficace. Notre étude montre également un transport axonal pour tous les sérotypes. Un éventuel passage transsynaptique pourra être mis en évidence grâce à l'hybridation *in situ* par l'existence de motoneurons transduits. Il est important, également, dans une étude ultérieure d'améliorer la précision des injections. Bien que les coordonnées stéréotaxiques aient été déterminées par IRM pour tous les macaques, le cadre stéréotaxique utilisé pour l'IRM et celui pour l'injection étaient différents pouvant conduire à des imprécisions au moment de l'injection. Une IRM post-injection pour vérifier le site d'injection pourrait être envisagée. Des nouveaux sérotypes caractérisés récemment ont montré une meilleure efficacité de transduction dans le cerveau de rongeurs (Cearley and Wolfe, 2006; Harding *et al.*, 2006). Il pourrait être intéressant d'évaluer leur efficacité de transduction et leur tropisme dans le SNC de primates. Egalement, il est important de déterminer la dissémination de ces différents sérotypes dans les fluides biologiques et les organes à distance après une injection intracérébrale. Un sérotype comme l'AAVr 8, présentant un tropisme large du fait de sa

fixation à un récepteur ubiquitaire, peut être éventuellement inadapté pour certaines applications cliniques.

CONCLUSION GENERALE

De plus en plus d'essais cliniques utilisant des vecteurs AAVr se développent. Pour arriver à l'essai clinique plusieurs étapes sont à valider avec succès. Notre première étude met en avant la nécessité de caractériser les stocks d'AAVr produits et d'utiliser éventuellement des méthodes de production alternatives. Le mécanisme permettant une encapsidation de séquences plasmidiques n'est pas réellement élucidé. Il nécessite cependant une réplication de ces séquences avant l'encapsidation. Une première approche pour permettre une production dépourvue de particules contaminantes pourrait être d'éliminer au maximum les origines de réplication. Une meilleure compréhension des mécanismes d'encapsidation permettrait sûrement d'empêcher plus efficacement la génération de particules contaminantes. Nous n'avons pas poursuivi cette thématique au laboratoire. Toutefois, suite aux résultats obtenus, les plasmides vecteurs ont été modifiés. Le gène de résistance à l'ampicilline a été remplacé par le gène de résistance à la kanamycine, moins controversés pour des applications humaines.

Une fois la sécurité des stocks établis il est nécessaire de tester ces vecteurs en transfert de gène *in vivo*. Des études préliminaires effectuées chez la souris MPS I ont montré qu'il était possible de corriger les lésions neuropathologiques après injection intrastriale d'un vecteur AAVr-Idua. Après ces résultats encourageant nous avons voulu évaluer le potentiel thérapeutique d'un vecteur AAVr 5-Idua dans le SNC d'un modèle canin MPS I. L'avantage des modèles gros animaux est qu'ils permettent d'anticiper les contraintes et les limites du traitement qui pourraient être rencontrées chez l'homme. Nous avons validé la procédure chirurgicale. Quatre injections stéréotaxiques permettent une correction des lésions neuropathologiques dans la totalité du cerveau de chien. Ce nombre d'injections est éthiquement envisageable chez un jeune enfant. De plus il n'y a pas de risques chirurgicaux majeurs en ciblant le putamen et le centre semi-ovale. D'autres types de traitements moins invasifs pourraient cependant être envisagés pour corriger les atteintes neurologiques dans les maladies de surcharge lysosomale. Les lésions de surcharge dans ces maladies sont diffuses dans la totalité du cerveau. L'objectif n'est donc pas de cibler une région précise du SNC. L'injection intrathécale d'un vecteur AAVr, moins invasive qu'une injection intraparenchymateuse, pourrait être une approche intéressante. L'administration intrathécale d'AAVr 2-Idua a donc été évaluée chez des souris MPS I (Watson *et al.*, 2006). Certaines

souris ont reçu de fortes doses de vecteurs (4×10^{10} particules totales) et d'autres de faibles doses (2×10^9 particules totales). Les résultats montrent une activité Idua largement, mais non uniformément, distribuée dans le cerveau. Suite à l'injection de fortes doses de vecteurs, les souris mutantes présentent une activité enzymatique supérieure ou égale à la normale. L'examen histopathologique de ces souris montre une élimination ou une réduction importante des lésions de surcharge, en particulier au niveau des cellules de Purkinje. L'injection de faibles doses de vecteurs entraîne une correction incomplète des lésions de surcharge. L'injection intraventriculaire d'un vecteur AAVr 4 a également été testée dans un modèle murin MPS VII (Liu *et al.*, 2005a). L'AAVr 4 transduit très efficacement les cellules épendymaires. Dans cette étude, les cellules épendymaires ont pu constituer une source de production d'enzyme permettant la correction phénotype du SNC des souris injectées. Ces deux études ont montré une correction de la totalité des lésions de surcharge après administration intrathécale d'un vecteur AAVr, il apparaît, cependant, peu probable d'obtenir une correction de la totalité des lésions de surcharge dans le SNC en transduisant exclusivement les cellules épendymaires chez l'enfant. L'injection intraventriculaire d'un vecteur AAVr 1, AAVr 2 ou AAVr 8 chez des souris nouveaux nés permet une transduction des neurones et une diffusion large du vecteur dans le SNC (Broekman *et al.*, 2006). L'étude chez des souris nouveaux-nés introduit un biais. En effet la période néo-natale chez la souris est caractérisée par une perméabilité des barrières physiologiques, et donc de la barrière hémato-encéphalique, favorisant ainsi le passage du vecteur dans le parenchyme. Chez des souris adultes, aucune transduction du parenchyme n'est observée après injection intraventriculaire d'un vecteur AAVr 2 (Lo *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2000). En revanche, il a été montré récemment une transduction de multiples régions cérébrales après injection intraventriculaire d'un vecteur AAVr 1 chez un rat adulte (Li *et al.*, 2006). Avec la caractérisation de nouveaux sérotypes, il apparaît intéressant d'évaluer leur diffusion dans le parenchyme après une administration intraventriculaire. Une autre approche potentiellement intéressante dans le traitement des maladies de surcharge lysosomale pourrait être de faire produire par le foie l'enzyme manquante associée à une séquence lui permettant de passer la barrière hémato-encéphalique (LDL ou Tat). Cette approche permettrait de corriger les lésions de surcharge en périphérie et dans le SNC.

L'étude chez les chiens MPS I nous a également permis de mettre en évidence une réponse inflammatoire et humorale secondaire à l'injection intracérébrale d'un vecteur AAVr et à l'expression d'une protéine exogène. De plus en plus d'études montrent le développement

d'une réponse immunitaire humorale dirigée contre la capside et/ou le produit de transgène après injection d'un vecteur AAVr. Le contrôle des réponses immunitaires est un point central pour le maintien d'une expression stable et à long terme. Nous avons montré dans notre étude qu'il était possible de juguler la réponse immunitaire en administrant un traitement immunosuppresseur fort. Ce traitement est déjà utilisée en clinique chez les greffés. Il s'agit malgré tout d'un traitement lourd. Il pourrait être intéressant de développer des stratégies entraînant l'induction d'une tolérance vis-à-vis du produit de transgène (Kakkis *et al.*, 2004a).

Dans notre étude chez les chiens MPS I nous obtenons au site d'injection une activité enzymatique Idua supraphysiologique. Cette surexpression n'a pas eu d'effets secondaires indésirables dans notre étude. Elle soulève cependant une question intéressante : comment contrôler l'expression d'un transgène *in vivo* ? Certains produits de transgène peuvent présenter une toxicité pour les cellules. Il est donc nécessaire de contrôler leur expression. Cela peut être fait, tout d'abord, en utilisant un promoteur spécifique. Des systèmes de régulation ont également été développés : la tétracycline et son dérivé doxycycline (Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995), l'ecdysone (No *et al.*, 1996), le mifepristone (Wang *et al.*, 1994), et la rapamycine (Rivera *et al.*, 1996). Ces systèmes sont basés sur l'utilisation de facteurs de transcription chimérique. Ces complexes, en se fixant sur des séquences opératrices spécifiques, clonées en amont d'un promoteur, permettent d'activer l'expression du transgène. Ces systèmes sont pour le moment à optimiser. Ils ne permettent pas une expression totalement contrôlée du transgène. Il existe toujours une expression basale.

Dans notre étude chez les chiens MPS I, nous avons utilisé un vecteur AAVr 5. Celui-ci montre une meilleure diffusion que l'AAVr 2 dans le SNC de souris. D'autres sérotypes ont été caractérisés depuis, montrant une meilleure diffusion et une meilleure efficacité de transduction après injection intracérébrale. Toutefois, le profil de transduction des différents sérotypes a été évalué principalement dans le cerveau de rongeurs. Il semblerait que l'efficacité de transduction d'un sérotype puisse varier selon l'espèce. Il apparaît donc nécessaire pour choisir le sérotype idéal pour une application donnée en clinique d'évaluer le profil de transduction de chaque sérotype dans le SNC d'un animal plus proche de l'homme : le primate. Cette étude doit s'accompagner d'une étude de biodistribution complète dans les fluides biologiques et les organes à distance. Il s'agit d'informations nécessaires et indispensables avant la mise en place d'un essai clinique chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- AITKEN, M.L., MOSS, R.B., WALTZ, D.A., DOVEY, M.E., TONELLI, M.R., MCNAMARA, S.C., GIBSON, R.L., RAMSEY, B.W., CARTER, B.J., and REYNOLDS, T.C. (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther* **12**, 1907-1916.
- AKACHE, B., GRIMM, D., PANDEY, K., YANT, S.R., XU, H., and KAY, M.A. (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* **80**, 9831-9836.
- ALISKY, J.M., HUGHES, S.M., SAUTER, S.L., JOLLY, D., DUBENSKY, T.W., JR., STABER, P.D., CHIORINI, J.A., and DAVIDSON, B.L. (2000). Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport* **11**, 2669-2673.
- ALLEN, J.M., DEBELAK, D.J., REYNOLDS, T.C., and MILLER, A.D. (1997). Identification and elimination of replication-competent adeno-associated virus (AAV) that can arise by nonhomologous recombination during AAV vector production. *J Virol* **71**, 6816-6822.
- ALROY, J., HASKINS, M., and BIRK, D.E. (1999). Altered corneal stromal matrix organization is associated with mucopolysaccharidosis I, III and VI. *Exp Eye Res* **68**, 523-530.
- ANSON, D.S., MULLER, V., BIELICKI, J., HARPER, G.S., and HOPWOOD, J.J. (1993). Overexpression of N-acetylgalactosamine-4-sulphatase induces a multiple sulphatase deficiency in mucopolysaccharidosis-type-VI fibroblasts. *Biochem J* **294 (Pt 3)**, 657-662.
- ATCHISON, R.W., CASTO, B.C., and HAMMON, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-756.
- AURICCHIO, A., O'CONNOR, E., HILDINGER, M., and WILSON, J.M. (2001). A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* **4**, 372-374.
- AVILA, J.L., and CONVIT, J. (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem J* **152**, 57-64.
- BACH, G., MOSKOWITZ, S.M., TIEU, P.T., MATYNIA, A., and NEUFELD, E.F. (1993). Molecular analysis of Hurler syndrome in Druze and Muslim Arab patients in Israel: multiple allelic mutations of the IDUA gene in a small geographic area. *Am J Hum Genet* **53**, 330-338.
- BAEKELANDT, V., DE STROOPER, B., NUTTIN, B., and DEBYSER, Z. (2000). Gene therapeutic strategies for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Mol Ther* **2**, 540-554.
- BANKIEWICZ, K.S., EBERLING, J.L., KOHUTNICKA, M., JAGUST, W., PIVIROTTO, P., BRINGAS, J., CUNNINGHAM, J., BUDINGER, T.F., and HARVEY-WHITE, J. (2000). Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp Neurol* **164**, 2-14.
- BANKIEWICZ, K.S., FORSAYETH, J., EBERLING, J.L., SANCHEZ-PERNAUTE, R., PIVIROTTO, P., BRINGAS, J., HERSCOVITCH, P., CARSON, R.E., ECKELMAN, W., REUTTER, B., and CUNNINGHAM, J. (2006). Long-term clinical improvement

- in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther* **14**, 564-570.
- BANTEL-SCHAAL, U., DELIUS, H., SCHMIDT, R., and ZUR HAUSEN, H. (1999). Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses. *J Virol* **73**, 939-947.
- BANTEL-SCHAAL, U., and ZUR HAUSEN, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* **134**, 52-63.
- BARSOUM, S.C., MILGRAM, W., MACKAY, W., COBLENTZ, C., DELANEY, K.H., KWIECIEN, J.M., KRUTH, S.A., and CHANG, P.L. (2003). Delivery of recombinant gene product to canine brain with the use of microencapsulation. *J Lab Clin Med* **142**, 399-413.
- BARTLETT, J.S., KLEINSCHMIDT, J., BOUCHER, R.C., and SAMULSKI, R.J. (1999). Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab γ)₂ antibody. *Nat Biotechnol* **17**, 181-186.
- BARTLETT, J.S., SAMULSKI, R.J., and MCCOWN, T.J. (1998). Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum Gene Ther* **9**, 1181-1186.
- BARTLETT, J.S., WILCHER, R., and SAMULSKI, R.J. (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**, 2777-2785.
- BAUMKOTTER, J., and CANTZ, M. (1983). Decreased ganglioside neuraminidase activity in fibroblasts from mucopolysaccharidosis patients. Inhibition of the activity in vitro by sulfated glycosaminoglycans and other compounds. *Biochim Biophys Acta* **761**, 163-170.
- BAXTER, M.A., WYNN, R.F., DEAKIN, J.A., BELLANTUONO, I., EDINGTON, K.G., COOPER, A., BESLEY, G.T., CHURCH, H.J., WRAITH, J.E., CARR, T.F., and FAIRBAIRN, L.J. (2002). Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I. *Blood* **99**, 1857-1859.
- BEARER, E.L., BREAKFIELD, X.O., SCHUBACK, D., REESE, T.S., and LAVAIL, J.H. (2000). Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8146-8150.
- BEATON, A., PALUMBO, P., and BERNIS, K.I. (1989). Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol* **63**, 4450-4454.
- BECK, M. (2001). Variable clinical presentation in lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**, 47-51; discussion 45-46.
- BERNIS, K.I., and GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 1-23.
- BIFFI, A., and NALDINI, L. (2005). Gene therapy of storage disorders by retroviral and lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **16**, 1133-1142.
- BIRKENMEIER, E.H., BARKER, J.E., VOGLER, C.A., KYLE, J.W., SLY, W.S., GWYNN, B., LEVY, B., and PEGORS, C. (1991). Increased life span and correction of metabolic defects in murine mucopolysaccharidosis type VII after syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* **78**, 3081-3092.
- BLACKLOW, N.R., HOGGAN, M.D., and ROWE, W.P. (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *J Natl Cancer Inst* **40**, 319-327.
- BLACKLOW, N.R., HOGGAN, M.D., SERENO, M.S., BRANDT, C.D., KIM, H.W., PARROTT, R.H., and CHANOCK, R.M. (1971). A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* **94**, 359-366.

- BLANKINSHIP, M.J., GREGOREVIC, P., ALLEN, J.M., HARPER, S.Q., HARPER, H., HALBERT, C.L., MILLER, D.A., and CHAMBERLAIN, J.S. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* **10**, 671-678.
- BLOUIN, V., BRUMENT, N., TOUBLANC, E., RAIMBAUD, I., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2004). Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S223-228.
- BOBO, R.H., LASKE, D.W., AKBASAK, A., MORRISON, P.F., DEDRICK, R.L., and OLDFIELD, E.H. (1994). Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2076-2080.
- BOSCH, A., PERRET, E., DESMARIS, N., and HEARD, J.M. (2000). Long-term and significant correction of brain lesions in adult mucopolysaccharidosis type VII mice using recombinant AAV vectors. *Mol Ther* **1**, 63-70.
- BRANDT, J., BYLSMA, F.W., GROSS, R., STINE, O.C., RANEN, N., and ROSS, C.A. (1996). Trinucleotide repeat length and clinical progression in Huntington's disease. *Neurology* **46**, 527-531.
- BRAUNLIN, E.A., STAUFFER, N.R., PETERS, C.H., BASS, J.L., BERRY, J.M., HOPWOOD, J.J., and KRIVIT, W. (2003). Usefulness of bone marrow transplantation in the Hurler syndrome. *Am J Cardiol* **92**, 882-886.
- BROEKMAN, M.L., COMER, L.A., HYMAN, B.T., and SENA-ESTEVEZ, M. (2006). Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV-1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. *Neuroscience* **138**, 501-510.
- BROOKS, A.I., STEIN, C.S., HUGHES, S.M., HETH, J., MCCRAY, P.M., JR., SAUTER, S.L., JOHNSTON, J.C., CORY-SLECHTA, D.A., FEDEROFF, H.J., and DAVIDSON, B.L. (2002). Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6216-6221.
- BRUMENT, N., MORENWEISER, R., BLOUIN, V., TOUBLANC, E., RAIMBAUD, I., CHEREL, Y., FOLLIOT, S., GADEN, F., BOULANGER, P., KRONER-LUX, G., MOULLIER, P., ROLLING, F., and SALVETTI, A. (2002). A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Mol Ther* **6**, 678-686.
- BUNNELL, B.A., and MORGAN, R.A. (1998). Gene therapy for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **11**, 42-56.
- BURGER, C., GORBATYUK, O.S., VELARDO, M.J., PEDEN, C.S., WILLIAMS, P., ZOLOTUKHIN, S., REIER, P.J., MANDEL, R.J., and MUZYCZKA, N. (2004). Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther* **10**, 302-317.
- BURGER, C., NASH, K., and MANDEL, R.J. (2005). Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Hum Gene Ther* **16**, 781-791.
- BYERS, S., ROZAKLIS, T., BRUMFIELD, L.K., RANIERI, E., and HOPWOOD, J.J. (1998). Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* **65**, 282-290.
- CAILLAUD, C., and POENARU, L. (2000). Gene therapy in lysosomal diseases. *Biomed Pharmacother* **54**, 505-512.
- CARLSSON, T., WINKLER, C., BURGER, C., MUZYCZKA, N., MANDEL, R.J., CENCI, A., BJORKLUND, A., and KIRIK, D. (2005). Reversal of dyskinesias in an animal

- model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors. *Brain* **128**, 559-569.
- CEARLEY, C.N., and WOLFE, J.H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther* **13**, 528-537.
- CHADEUF, G., FAVRE, D., TESSIER, J., PROVOST, N., NONY, P., KLEINSCHMIDT, J., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2000). Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med* **2**, 260-268.
- CHAMBERLIN, N.L., DU, B., DE LACALLE, S., and SAPER, C.B. (1998). Recombinant adeno-associated virus vector: use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res* **793**, 169-175.
- CHAO, H., SUN, L., BRUCE, A., XIAO, X., and WALSH, C.E. (2002). Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther* **5**, 716-722.
- CHEN, C.L., JENSEN, R.L., SCHNEPP, B.C., CONNELL, M.J., SHELL, R., SFERRA, T.J., BARTLETT, J.S., CLARK, K.R., and JOHNSON, P.R. (2005). Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* **79**, 14781-14792.
- CHEN, H., MCCARTY, D.M., BRUCE, A.T., and SUZUKI, K. (1998). Gene transfer and expression in oligodendrocytes under the control of myelin basic protein transcriptional control region mediated by adeno-associated virus. *Gene Ther* **5**, 50-58.
- CHEN, Z.Y., HE, C.Y., EHRHARDT, A., and KAY, M.A. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* **8**, 495-500.
- CHENUAUD, P., LARCHER, T., RABINOWITZ, J.E., PROVOST, N., CHEREL, Y., CASADEVALL, N., SAMULSKI, R.J., and MOULLIER, P. (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**, 3303-3304.
- CHIRMULE, N., MOFFETT, J., DHAGAT, P., TAZELAAR, J., and WILSON, J.M. (1999a). Adenoviral vector-mediated gene therapy in the mouse lung: no role of Fas-Fas ligand interactions for elimination of transgene expression in bronchioepithelial cells. *Hum Gene Ther* **10**, 2839-2846.
- CHIRMULE, N., PROPERT, K., MAGOSIN, S., QIAN, Y., QIAN, R., and WILSON, J. (1999b). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**, 1574-1583.
- CIRON, C., DESMARIS, N., COLLE, M.A., RAOUL, S., JOUSSEMET, B., VEROT, L., AUSSEIL, J., FROISSART, R., ROUX, F., CHEREL, Y., FERRY, N., LAJAT, Y., SCHWARTZ, B., VANIER, M.T., MAIRE, I., TARDIEU, M., MOULLIER, P., and HEARD, J.M. (2006). Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann Neurol* **60**, 204-213.
- CLARKE, L.A., RUSSELL, C.S., POWNALL, S., WARRINGTON, C.L., BOROWSKI, A., DIMMICK, J.E., TOONE, J., and JIRIK, F.R. (1997). Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine alpha-L-iduronidase gene. *Hum Mol Genet* **6**, 503-511.
- CONSTANTOPOULOS, G., and DEKABAN, A.S. (1978). Neurochemistry of the mucopolysaccharidoses: brain lipids and lysosomal enzymes in patients with four types of mucopolysaccharidosis and in normal controls. *J Neurochem* **30**, 965-973.
- CONSTANTOPOULOS, G., SHULL, R.M., HASTINGS, N., and NEUFELD, E.F. (1985). Neurochemical characterization of canine alpha-L-iduronidase deficiency disease (model of human mucopolysaccharidosis I). *J Neurochem* **45**, 1213-1217.

- CRESSANT, A., DESMARIS, N., VEROT, L., BREJOT, T., FROISSART, R., VANIER, M.T., MAIRE, I., and HEARD, J.M. (2004). Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J Neurosci* **24**, 10229-10239.
- CUCCHIARINI, M., REN, X.L., PERIDES, G., and TERWILLIGER, E.F. (2003). Selective gene expression in brain microglia mediated via adeno-associated virus type 2 and type 5 vectors. *Gene Ther* **10**, 657-667.
- CUNNINGHAM, J., OIWA, Y., NAGY, D., PODSAKOFF, G., COLOSI, P., and BANKIEWICZ, K.S. (2000). Distribution of AAV-TK following intracranial convection-enhanced delivery into rats. *Cell Transplant* **9**, 585-594.
- DALY, T.M., VOGLER, C., LEVY, B., HASKINS, M.E., and SANDS, M.S. (1999). Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2296-2300.
- DAVIDSON, B.L., and PAULSON, H.L. (2004). Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* **3**, 145-149.
- DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., HETH, J.A., MARTINS, I., KOTIN, R.M., DERKSEN, T.A., ZABNER, J., GHODSI, A., and CHIORINI, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3428-3432.
- DESMARIS, N., VEROT, L., PUECH, J.P., CAILLAUD, C., VANIER, M.T., and HEARD, J.M. (2004). Prevention of neuropathology in the mouse model of Hurler syndrome. *Ann Neurol* **56**, 68-76.
- DI DOMENICO, C., VILLANI, G.R., DI NAPOLI, D., REYERO, E.G., LOMBARDO, A., NALDINI, L., and DI NATALE, P. (2005). Gene therapy for a mucopolysaccharidosis type I murine model with lentiviral-IDUA vector. *Hum Gene Ther* **16**, 81-90.
- DI NATALE, P., DI DOMENICO, C., VILLANI, G.R., LOMBARDO, A., FOLLENZI, A., and NALDINI, L. (2002). In vitro gene therapy of mucopolysaccharidosis type I by lentiviral vectors. *Eur J Biochem* **269**, 2764-2771.
- DI PASQUALE, G., DAVIDSON, B.L., STEIN, C.S., MARTINS, I., SCUDIERO, D., MONKS, A., and CHIORINI, J.A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**, 1306-1312.
- DING, W., ZHANG, L., YAN, Z., and ENGELHARDT, J.F. (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* **12**, 873-880.
- DISTLER, J., HIEBER, V., SAHAGIAN, G., SCHMICKEL, R., and JOURDIAN, G.W. (1979). Identification of mannose 6-phosphate in glycoproteins that inhibit the assimilation of beta-galactosidase by fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4235-4239.
- DONELLO, J.E., LOEB, J.E., and HOPE, T.J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* **72**, 5085-5092.
- DONG, J.Y., FAN, P.D., and FRIZZELL, R.A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* **7**, 2101-2112.
- DUAN, D., LI, Q., KAO, A.W., YUE, Y., PESSIN, J.E., and ENGELHARDT, J.F. (1999). Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **73**, 10371-10376.
- DUAN, D., SHARMA, P., YANG, J., YUE, Y., DUDUS, L., ZHANG, Y., FISHER, K.J., and ENGELHARDT, J.F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* **72**, 8568-8577.

- DUAN, D., YUE, Y., and ENGELHARDT, J.F. (2001). Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol Ther* **4**, 383-391.
- DUDUS, L., ANAND, V., ACLAND, G.M., CHEN, S.J., WILSON, J.M., FISHER, K.J., MAGUIRE, A.M., and BENNETT, J. (1999). Persistent transgene product in retina, optic nerve and brain after intraocular injection of rAAV. *Vision Res* **39**, 2545-2553.
- EDSTROM, A., HANSON, M., WALLIN, M., and CEDERHOLM, B. (1979). Inhibition of fast axonal transport and microtubule polymerization in vitro by colchicine and colchicine. *Acta Physiol Scand* **107**, 233-237.
- ELLINWOOD, N.M., VITE, C.H., and HASKINS, M.E. (2004). Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med* **6**, 481-506.
- ERLES, K., SEBOKOVA, P., and SCHLEHOFER, J.R. (1999). Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* **59**, 406-411.
- ESLAMBOLI, A., GEORGIEVSKA, B., RIDLEY, R.M., BAKER, H.F., MUZYCZKA, N., BURGER, C., MANDEL, R.J., ANNETT, L., and KIRIK, D. (2005). Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **25**, 769-777.
- FAIRBAIRN, L.J., LASHFORD, L.S., SPOONER, E., MCDERMOTT, R.H., LEBENS, G., ARRAND, J.E., ARRAND, J.R., BELLANTUONO, I., HOLT, R., HATTON, C.E., COOPER, A., BESLEY, G.T., WRAITH, J.E., ANSON, D.S., HOPWOOD, J.J., and DEXTER, T.M. (1996). Long-term in vitro correction of alpha-L-iduronidase deficiency (Hurler syndrome) in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2025-2030.
- FAVRE, D., BLOUIN, V., PROVOST, N., SPISEK, R., PORROT, F., BOHL, D., MARME, F., CHEREL, Y., SALVETTI, A., HURTREL, B., HEARD, J.M., RIVIERE, Y., and MOULLIER, P. (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* **76**, 11605-11611.
- FAVRE, D., CHEREL, Y., PROVOST, N., BLOUIN, V., FERRY, N., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2000). Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. *Gene Ther* **7**, 1417-1420.
- FAVRE, D., PROVOST, N., BLOUIN, V., BLANCHO, G., CHEREL, Y., SALVETTI, A., and MOULLIER, P. (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **4**, 559-566.
- FIELDS, P.A., KOWALCZYK, D.W., ARRUDA, V.R., ARMSTRONG, E., MCCLELAND, M.L., HAGSTROM, J.N., PASI, K.J., ERTL, H.C., HERZOG, R.W., and HIGH, K.A. (2000). Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther* **1**, 225-235.
- FISCHER, T.A., LEHR, H.A., NIXDORFF, U., and MEYER, J. (1999). Combined aortic and mitral stenosis in mucopolysaccharidosis type I-S (Ullrich-Scheie syndrome). *Heart* **81**, 97-99.
- FISHER-ADAMS, G., WONG, K.K., JR., PODSAKOFF, G., FORMAN, S.J., and CHATTERJEE, S. (1996). Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood* **88**, 492-504.
- FLOTTE, T., CARTER, B., CONRAD, C., GUGGINO, W., REYNOLDS, T., ROSENSTEIN, B., TAYLOR, G., WALDEN, S., and WETZEL, R. (1996). A phase I

- study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* **7**, 1145-1159.
- FLOTTE, T.R. (2004). Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* **11**, 805-810.
- FLOTTE, T.R. (2005). Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders. *Pediatr Res* **58**, 1143-1147.
- FLOTTE, T.R., ZEITLIN, P.L., REYNOLDS, T.C., HEALD, A.E., PEDERSEN, P., BECK, S., CONRAD, C.K., BRASS-ERNST, L., HUMPHRIES, M., SULLIVAN, K., WETZEL, R., TAYLOR, G., CARTER, B.J., and GUGGINO, W.B. (2003). Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther* **14**, 1079-1088.
- FORSAYETH, J.R., EBERLING, J.L., SANFTNER, L.M., ZHEN, Z., PIVIROTTI, P., BRINGAS, J., CUNNINGHAM, J., and BANKIEWICZ, K.S. (2006). A dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in parkinsonian monkeys. *Mol Ther* **14**, 571-577.
- FOWLER, G.W., SUKOFF, M., HAMILTON, A., and WILLIAMS, J.P. (1975). Communicating hydrocephalus in children with genetic inborn errors of metabolism. *Childs Brain* **1**, 251-254.
- FRATANTONI, J.C., HALL, C.W., and NEUFELD, E.F. (1968). Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* **162**, 570-572.
- FRISELLA, W.A., O'CONNOR, L.H., VOGLER, C.A., ROBERTS, M., WALKLEY, S., LEVY, B., DALY, T.M., and SANDS, M.S. (2001). Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* **3**, 351-358.
- FULLER, M., BROOKS, D.A., EVANGELISTA, M., HEIN, L.K., HOPWOOD, J.J., and MEIKLE, P.J. (2005). Prediction of neuropathology in mucopolysaccharidosis I patients. *Mol Genet Metab* **84**, 18-24.
- GAO, G., LEBHERZ, C., WEINER, D.J., GRANT, R., CALCEDO, R., MCCULLOUGH, B., BAGG, A., ZHANG, Y., and WILSON, J.M. (2004a). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**, 3300-3302.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J.M. (2004b). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**, 6381-6388.
- GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., and WILSON, J.M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* **5**, 285-297.
- GAO, G.P., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., and WILSON, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11854-11859.
- GAO, G.P., LU, Y., SUN, X., JOHNSTON, J., CALCEDO, R., GRANT, R., and WILSON, J.M. (2006). High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol* **80**, 6192-6194.
- GAO, G.P., QU, G., FAUST, L.Z., ENGDAHL, R.K., XIAO, W., HUGHES, J.V., ZOLTICK, P.W., and WILSON, J.M. (1998). High-titer adeno-associated viral vectors from a Rep/Cap cell line and hybrid shuttle virus. *Hum Gene Ther* **9**, 2353-2362.
- GE, Y., POWELL, S., VAN ROEY, M., and MCARTHUR, J.G. (2001). Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* **97**, 3733-3737.

- GEORG-FRIES, B., BIEDERLACK, S., WOLF, J., and ZUR HAUSEN, H. (1984). Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* **134**, 64-71.
- GIGOUT, L., REBOLLO, P., CLEMENT, N., WARRINGTON, K.H., JR., MUZYCZKA, N., LINDEN, R.M., and WEBER, T. (2005). Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther* **11**, 856-865.
- GINSBERG, S.D., GALVIN, J.E., LEE, V.M., RORKE, L.B., DICKSON, D.W., WOLFE, J.H., JONES, M.Z., and TROJANOWSKI, J.Q. (1999). Accumulation of intracellular amyloid-beta peptide (A beta 1-40) in mucopolysaccharidosis brains. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 815-824.
- GONDRE-LEWIS, M.C., MCGLYNN, R., and WALKLEY, S.U. (2003). Cholesterol accumulation in NPC1-deficient neurons is ganglioside dependent. *Curr Biol* **13**, 1324-1329.
- GOSSEN, M., and BUJARD, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W., and BUJARD, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
- GOYENVALLE, A., VULIN, A., FOUGEROUSSE, F., LETURCQ, F., KAPLAN, J.C., GARCIA, L., and DANOS, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**, 1796-1799.
- GREELISH, J.P., SU, L.T., LANKFORD, E.B., BURKMAN, J.M., CHEN, H., KONIG, S.K., MERCIER, I.M., DESJARDINS, P.R., MITCHELL, M.A., ZHENG, X.G., LEFEROVICH, J., GAO, G.P., BALICE-GORDON, R.J., WILSON, J.M., and STEDMAN, H.H. (1999). Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med* **5**, 439-443.
- GRIMM, D., KERN, A., RITTNER, K., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2745-2760.
- GRIMM, D., ZHOU, S., NAKAI, H., THOMAS, C.E., STORM, T.A., FUESS, S., MATSUSHITA, T., ALLEN, J., SUROSKY, R., LOCHRIE, M., MEUSE, L., MCCLELLAND, A., COLOSI, P., and KAY, M.A. (2003). Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy. *Blood* **102**, 2412-2419.
- GUSELLA, J.F., and MACDONALD, M.E. (1995). Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 656-662.
- HABERMAN, R.P., MCCOWN, T.J., and SAMULSKI, R.J. (1998). Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Ther* **5**, 1604-1611.
- HABERMAN, R.P., MCCOWN, T.J., and SAMULSKI, R.J. (2000). Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* **74**, 8732-8739.
- HADACZEK, P., KOHUTNICKA, M., KRAUZE, M.T., BRINGAS, J., PIVIROTTO, P., CUNNINGHAM, J., and BANKIEWICZ, K. (2006). Convection-enhanced delivery of adeno-associated virus type 2 (AAV2) into the striatum and transport of AAV2 within monkey brain. *Hum Gene Ther* **17**, 291-302.
- HADACZEK, P., MIREK, H., BRINGAS, J., CUNNINGHAM, J., and BANKIEWICZ, K. (2004). Basic fibroblast growth factor enhances transduction, distribution, and axonal

- transport of adeno-associated virus type 2 vector in rat brain. *Hum Gene Ther* **15**, 469-479.
- HALBERT, C.L., ALLEN, J.M., and MILLER, A.D. (2002). Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene. *Nat Biotechnol* **20**, 697-701.
- HALBERT, C.L., STANDAERT, T.A., WILSON, C.B., and MILLER, A.D. (1998). Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol* **72**, 9795-9805.
- HAMILTON, J.F., MORRISON, P.F., CHEN, M.Y., HARVEY-WHITE, J., PERNAUTE, R.S., PHILLIPS, H., OLDFIELD, E., and BANKIEWICZ, K.S. (2001). Heparin coinjection during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* **168**, 155-161.
- HANDA, A., MURAMATSU, S., QIU, J., MIZUKAMI, H., and BROWN, K.E. (2000). Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J Gen Virol* **81**, 2077-2084.
- HANSEN, J., QING, K., and SRIVASTAVA, A. (2001). Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* **4**, 289-296.
- HANSSON, H.A., HOLMGREN, J., and SVENNERHOLM, L. (1977). Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3782-3786.
- HARA, H., MONSONEGO, A., YUASA, K., ADACHI, K., XIAO, X., TAKEDA, S., TAKAHASHI, K., WEINER, H.L., and TABIRA, T. (2004). Development of a safe oral Abeta vaccine using recombinant adeno-associated virus vector for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **6**, 483-488.
- HARDING, T.C., DICKINSON, P.J., ROBERTS, B.N., YENDLURI, S., GONZALEZ-EDICK, M., LECOUEUR, R.A., and JOOSS, K.U. (2006). Enhanced gene transfer efficiency in the murine striatum and an orthotopic glioblastoma tumor model, using AAV-7- and AAV-8-pseudotyped vectors. *Hum Gene Ther* **17**, 807-820.
- HARPER, S.Q., STABER, P.D., HE, X., ELIASON, S.L., MARTINS, I.H., MAO, Q., YANG, L., KOTIN, R.M., PAULSON, H.L., and DAVIDSON, B.L. (2005). RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5820-5825.
- HARTUNG, S.D., REDDY, R.G., WHITLEY, C.B., and MCIVOR, R.S. (1999). Enzymatic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type I fibroblasts by adeno-associated virus-mediated transduction of the alpha-L-iduronidase gene. *Hum Gene Ther* **10**, 2163-2172.
- HASKINS, M., CASAL, M., ELLINWOOD, N.M., MELNICZEK, J., MAZRIER, H., and GIGER, U. (2002). Animal models for mucopolysaccharidoses and their clinical relevance. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 88-97.
- HASKINS, M.E., JEZYK, P.F., DESNICK, R.J., MCDONOUGH, S.K., and PATTERSON, D.F. (1979). Alpha-L-iduronidase deficiency in a cat: a model of mucopolysaccharidosis I. *Pediatr Res* **13**, 1294-1297.
- HASKINS, M.E., JEZYK, P.F., DESNICK, R.J., MCGOVERN, M.M., VINE, D.T., and PATTERSON, D.F. (1982). Animal models of mucopolysaccharidosis. *Prog Clin Biol Res* **94**, 177-201.
- HAUCK, B., CHEN, L., and XIAO, W. (2003). Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther* **7**, 419-425.

- HAUCK, B., ZHAO, W., HIGH, K., and XIAO, W. (2004). Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol* **78**, 13678-13686.
- HAUST, M.D., and GORDON, B.A. (1986). Ultrastructural and biochemical aspects of the Sanfilippo syndrome,--type III genetic mucopolysaccharidosis. *Connect Tissue Res* **15**, 57-64.
- HE, X., LI, C.M., SIMONARO, C.M., WAN, Q., HASKINS, M.E., DESNICK, R.J., and SCHUCHMAN, E.H. (1999). Identification and characterization of the molecular lesion causing mucopolysaccharidosis type I in cats. *Mol Genet Metab* **67**, 106-112.
- HEFTI, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* **6**, 2155-2162.
- HENNIG, A.K., LEVY, B., OGILVIE, J.M., VOGLER, C.A., GALVIN, N., BASSNETT, S., and SANDS, M.S. (2003). Intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in specific areas of the CNS in mucopolysaccharidosis VII mice. *J Neurosci* **23**, 3302-3307.
- HERZOG, R.W., FIELDS, P.A., ARRUDA, V.R., BRUBAKER, J.O., ARMSTRONG, E., MCCLINTOCK, D., BELLINGER, D.A., COUTO, L.B., NICHOLS, T.C., and HIGH, K.A. (2002). Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**, 1281-1291.
- HERZOG, R.W., HAGSTROM, J.N., KUNG, S.H., TAI, S.J., WILSON, J.M., FISHER, K.J., and HIGH, K.A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5804-5809.
- HERZOG, R.W., MOUNT, J.D., ARRUDA, V.R., HIGH, K.A., and LOTHROP, C.D., JR. (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* **4**, 192-200.
- HERZOG, R.W., YANG, E.Y., COUTO, L.B., HAGSTROM, J.N., ELWELL, D., FIELDS, P.A., BURTON, M., BELLINGER, D.A., READ, M.S., BRINKHOUS, K.M., PODSAKOFF, G.M., NICHOLS, T.C., KURTZMAN, G.J., and HIGH, K.A. (1999). Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* **5**, 56-63.
- HILDINGER, M., AURICCHIO, A., GAO, G., WANG, L., CHIRMULE, N., and WILSON, J.M. (2001). Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol* **75**, 6199-6203.
- HIRATA, R.K., and RUSSELL, D.W. (2000). Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol* **74**, 4612-4620.
- HOBBS, J.R., HUGH-JONES, K., BARRETT, A.J., BYROM, N., CHAMBERS, D., HENRY, K., JAMES, D.C., LUCAS, C.F., ROGERS, T.R., BENSON, P.F., TANSLEY, L.R., PATRICK, A.D., MOSSMAN, J., and YOUNG, E.P. (1981). Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* **2**, 709-712.
- HOGGAN, M.D., BLACKLOW, N.R., and ROWE, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**, 1467-1474.
- HOOGERBRUGGE, P.M., BROUWER, O.F., BORDIGONI, P., RINGDEN, O., KAPAUN, P., ORTEGA, J.J., O'MEARA, A., CORNU, G., SOUILLET, G., FRAPPAZ, D., and ET AL. (1995). Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation. *Lancet* **345**, 1398-1402.

- HOPWOOD, J.J., and MORRIS, C.P. (1990). The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* **7**, 381-404.
- HORGER, B.A., NISHIMURA, M.C., ARMANINI, M.P., WANG, L.C., POULSEN, K.T., ROSENBLAD, C., KIRIK, D., MOFFAT, B., SIMMONS, L., JOHNSON, E., JR., MILBRANDT, J., ROSENTHAL, A., BJORKLUND, A., VANDLEN, R.A., HYNES, M.A., and PHILLIPS, H.S. (1998). Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* **18**, 4929-4937.
- HUA, C.T., HOPWOOD, J.J., CARLSSON, S.R., HARRIS, R.J., and MEIKLE, P.J. (1998). Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clin Chem* **44**, 2094-2102.
- HUANG, J.Q., TRASLER, J.M., IGDOURA, S., MICHAUD, J., HANAL, N., and GRAVEL, R.A. (1997a). Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet* **6**, 1879-1885.
- HUANG, M.M., WONG, A., YU, X., KAKKIS, E., and KOHN, D.B. (1997b). Retrovirus-mediated transfer of the human alpha-L-iduronidase cDNA into human hematopoietic progenitor cells leads to correction in trans of Hurler fibroblasts. *Gene Ther* **4**, 1150-1159.
- HULTBERG, B., ISAKSSON, A., SJOBLAD, S., and OCKERMAN, P.A. (1980). Acid hydrolases in serum from patients with lysosomal disorders. *Clin Chim Acta* **100**, 33-38.
- HUSZTHY, P.C., SVENDSEN, A., WILSON, J.M., KOTIN, R.M., LONNING, P.E., BJERKVIG, R., and HOOVER, F. (2005). Widespread dispersion of adeno-associated virus serotype 1 and adeno-associated virus serotype 6 vectors in the rat central nervous system and in human glioblastoma multiforme xenografts. *Hum Gene Ther* **16**, 381-392.
- HUTTNER, N.A., GIROD, A., PERABO, L., EDBAUER, D., KLEINSCHMIDT, J.A., BUNING, H., and HALLEK, M. (2003). Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene Ther* **10**, 2139-2147.
- ISNER, J.M. (2002). Myocardial gene therapy. *Nature* **415**, 234-239.
- JACOB, Y., BADRANE, H., CECCALDI, P.E., and TORDO, N. (2000). Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol* **74**, 10217-10222.
- JEZYK, P.F., HASKINS, M.E., and PATTERSON, D.F. (1982). Screening for inborn errors of metabolism in dogs and cats. *Prog Clin Biol Res* **94**, 93-116.
- JIANG, H., LILLICRAP, D., PATARROYO-WHITE, S., LIU, T., QIAN, X., SCALLAN, C.D., POWELL, S., KELLER, T., MCMURRAY, M., LABELLE, A., NAGY, D., VARGAS, J.A., ZHOU, S., COUTO, L.B., and PIERCE, G.F. (2006). Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* **108**, 107-115.
- JOLLY, R.D., and WALKLEY, S.U. (1997). Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. *Vet Pathol* **34**, 527-548.
- JOOSS, K., and CHIRMULE, N. (2003). Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther* **10**, 955-963.
- KACHUR, E., and DEL MAESTRO, R. (2000). Mucopolysaccharidoses and spinal cord compression: case report and review of the literature with implications of bone marrow transplantation. *Neurosurgery* **47**, 223-228; discussion 228-229.
- KAKAVANOS, R., TURNER, C.T., HOPWOOD, J.J., KAKKIS, E.D., and BROOKS, D.A. (2003). Immune tolerance after long-term enzyme-replacement therapy among patients who have mucopolysaccharidosis I. *Lancet* **361**, 1608-1613.

- KAKKIS, E., LESTER, T., YANG, R., TANAKA, C., ANAND, V., LEMONTT, J., PEINOVICH, M., and PASSAGE, M. (2004a). Successful induction of immune tolerance to enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 829-834.
- KAKKIS, E., MCENTEE, M., VOGLER, C., LE, S., LEVY, B., BELICHENKO, P., MOBLEY, W., DICKSON, P., HANSON, S., and PASSAGE, M. (2004b). Intrathecal enzyme replacement therapy reduces lysosomal storage in the brain and meninges of the canine model of MPS I. *Mol Genet Metab* **83**, 163-174.
- KAKKIS, E.D., MATYNIA, A., JONAS, A.J., and NEUFELD, E.F. (1994). Overexpression of the human lysosomal enzyme alpha-L-iduronidase in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr Purif* **5**, 225-232.
- KAKKIS, E.D., MCENTEE, M.F., SCHMIDTCHEN, A., NEUFELD, E.F., WARD, D.A., GOMPF, R.E., KANIA, S., BEDOLLA, C., CHIEN, S.L., and SHULL, R.M. (1996). Long-term and high-dose trials of enzyme replacement therapy in the canine model of mucopolysaccharidosis I. *Biochem Mol Med* **58**, 156-167.
- KAKKIS, E.D., MUENZER, J., TILLER, G.E., WABER, L., BELMONT, J., PASSAGE, M., IZYKOWSKI, B., PHILLIPS, J., DOROSHOW, R., WALOT, I., HOFT, R., and NEUFELD, E.F. (2001a). Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* **344**, 182-188.
- KAKKIS, E.D., SCHUCHMAN, E., HE, X., WAN, Q., KANIA, S., WIEMELT, S., HASSON, C.W., O'MALLEY, T., WEIL, M.A., AGUIRRE, G.A., BROWN, D.E., and HASKINS, M.E. (2001b). Enzyme replacement therapy in feline mucopolysaccharidosis I. *Mol Genet Metab* **72**, 199-208.
- KALUDOV, N., BROWN, K.E., WALTERS, R.W., ZABNER, J., and CHIORINI, J.A. (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**, 6884-6893.
- KAPLAN, A., ACHORD, D.T., and SLY, W.S. (1977). Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2026-2030.
- KAPLITT, M.G., LEONE, P., SAMULSKI, R.J., XIAO, X., PFAFF, D.W., O'MALLEY, K.L., and DURING, M.J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet* **8**, 148-154.
- KASHIWAKURA, Y., TAMAYOSE, K., IWABUCHI, K., HIRAI, Y., SHIMADA, T., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T., WATANABE, M., OSHIMI, K., and DAIDA, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **79**, 609-614.
- KASPAR, B.K., ERICKSON, D., SCHAFFER, D., HINH, L., GAGE, F.H., and PETERSON, D.A. (2002). Targeted retrograde gene delivery for neuronal protection. *Mol Ther* **5**, 50-56.
- KASPAR, B.K., LLADO, J., SHERKAT, N., ROTHSTEIN, J.D., and GAGE, F.H. (2003). Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* **301**, 839-842.
- KASPAR, B.K., VICH, J., CHRISTIAN, L., ROHSTEN, J.D., GAGE, F.H. (2004). AAV retrograde transport potential and therapeutic approaches for ALS. *Mol Ther* **9**, supp 1, s18-s19.
- KAY, M.A., MANNO, C.S., RAGNI, M.V., LARSON, P.J., COUTO, L.B., MCCLELLAND, A., GLADER, B., CHEW, A.J., TAI, S.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V., JOHNSON, F., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W.,

- and HIGH, K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**, 257-261.
- KHLEIF, S.N., MYERS, T., CARTER, B.J., and TREMPER, J.P. (1991). Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene. *Virology* **181**, 738-741.
- KING, J.A., DUBIELZIG, R., GRIMM, D., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* **20**, 3282-3291.
- KINT, J.A., DACREMONT, G., CARTON, D., ORYE, E., and HOOFT, C. (1973). Mucopolysaccharidosis: secondarily induced abnormal distribution of lysosomal isoenzymes. *Science* **181**, 352-354.
- KIRIK, D., GEORGIEVSKA, B., and BJORKLUND, A. (2004). Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* **7**, 105-110.
- KIRIK, D., GEORGIEVSKA, B., BURGER, C., WINKLER, C., MUZYCZKA, N., MANDEL, R.J., and BJORKLUND, A. (2002). Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4708-4713.
- KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y., and SHIMIZU, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- KLEIN, R.L., DAYTON, R.D., LEIDENHEIMER, N.J., JANSEN, K., GOLDE, T.E., and ZWEIG, R.M. (2006). Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther* **13**, 517-527.
- KLEIN, R.L., HIRKO, A.C., MEYERS, C.A., GRIMES, J.R., MUZYCZKA, N., and MEYER, E.M. (2000). NGF gene transfer to intrinsic basal forebrain neurons increases cholinergic cell size and protects from age-related, spatial memory deficits in middle-aged rats. *Brain Res* **875**, 144-151.
- KLEIN, R.L., MEYER, E.M., PEEL, A.L., ZOLOTUKHIN, S., MEYERS, C., MUZYCZKA, N., and KING, M.A. (1998). Neuron-specific transduction in the rat septohippocampal or nigrostriatal pathway by recombinant adeno-associated virus vectors. *Exp Neurol* **150**, 183-194.
- KLUGMANN, M., SYMES, C.W., LEICHTLEIN, C.B., KLAUSSNER, B.K., DUNNING, J., FONG, D., YOUNG, D., and DURING, M.J. (2005). AAV-mediated hippocampal expression of short and long Homer 1 proteins differentially affect cognition and seizure activity in adult rats. *Mol Cell Neurosci* **28**, 347-360.
- KOBAYASHI, H., CARBONARO, D., PEPPER, K., PETERSEN, D., GE, S., JACKSON, H., SHIMADA, H., MOATS, R., and KOHN, D.B. (2005). Neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector. *Mol Ther* **11**, 776-789.
- KOLTER, T., PROIA, R.L., and SANDHOFF, K. (2002). Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 25859-25862.
- KORDOWER, J.H., PALFI, S., CHEN, E.Y., MA, S.Y., SENDERA, T., COCHRAN, E.J., MUFSON, E.J., PENN, R., GOETZ, C.G., and COMELLA, C.D. (1999). Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol* **46**, 419-424.
- KOTIN, R.M. (1994). Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* **5**, 793-801.
- KOTIN, R.M., LINDEN, R.M., and BERNS, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* **11**, 5071-5078.

- KRUGER, R., KUHN, W., MULLER, T., WOITALLA, D., GRAEBER, M., KOSEL, S., PRZUNTEK, H., EPPLEN, J.T., SCHOLS, L., and RIESS, O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**, 106-108.
- KUGLER, S., LINGOR, P., SCHOLL, U., ZOLOTUKHIN, S., and BAHR, M. (2003). Differential transgene expression in brain cells in vivo and in vitro from AAV-2 vectors with small transcriptional control units. *Virology* **311**, 89-95.
- LABOW, M.A., GRAF, L.H., JR., and BERNIS, K.I. (1987). Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol* **7**, 1320-1325.
- LE BEC, C., and DOUAR, A.M. (2006). Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther* **13**, 805-813.
- LEDEEN, R.W. (1978). Ganglioside structures and distribution: are they localized at the nerve ending? *J Supramol Struct* **8**, 1-17.
- LEFF, S.E., SPRATT, S.K., SNYDER, R.O., and MANDEL, R.J. (1999). Long-term restoration of striatal L-aromatic amino acid decarboxylase activity using recombinant adeno-associated viral vector gene transfer in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **92**, 185-196.
- LEROY, E., ANASTASOPOULOS, D., KONITSIOTIS, S., LAVEDAN, C., and POLYMEROPOULOS, M.H. (1998). Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum Genet* **103**, 424-427.
- LI, S.F., WANG, R.Z., MENG, Q.H., LI, G.L., HU, G.J., DOU, W.C., LI, Z.J., and ZHANG, Z.X. (2006). Intra-ventricular infusion of rAAV1-EGFP resulted in transduction in multiple regions of adult rat brain: A comparative study with rAAV2 and rAAV5 vectors. *Brain Res*.
- LIEBERMAN, D.M., LASKE, D.W., MORRISON, P.F., BANKIEWICZ, K.S., and OLDFIELD, E.H. (1995). Convection-enhanced distribution of large molecules in gray matter during interstitial drug infusion. *J Neurosurg* **82**, 1021-1029.
- LINDEN, R.M., WARD, P., GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNIS, K.I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11288-11294.
- LIOR, S.S., JONES, M.Z., SUZUKI, M., BIEBERICH, E., and YU, R.K. (2001). Metabolic studies of glycosphingolipid accumulation in mucopolysaccharidosis IIID. *Mol Genet Metab* **72**, 239-247.
- LIU, G., MARTINS, I., WEMMIE, J.A., CHIORINI, J.A., and DAVIDSON, B.L. (2005a). Functional correction of CNS phenotypes in a lysosomal storage disease model using adeno-associated virus type 4 vectors. *J Neurosci* **25**, 9321-9327.
- LIU, G., MARTINS, I.H., CHIORINI, J.A., and DAVIDSON, B.L. (2005b). Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther* **12**, 1503-1508.
- LIU, Y., XU, L., HENNIG, A.K., KOVACS, A., FU, A., CHUNG, S., LEE, D., WANG, B., HERATI, R.S., MOSINGER OGILVIE, J., CAI, S.R., and PARKER PONDER, K. (2005c). Liver-directed neonatal gene therapy prevents cardiac, bone, ear, and eye disease in mucopolysaccharidosis I mice. *Mol Ther* **11**, 35-47.
- LJUNG, R.C. (1998). Can haemophilic arthropathy be prevented? *Br J Haematol* **101**, 215-219.

- LO, W.D., QU, G., SFERRA, T.J., CLARK, R., CHEN, R., and JOHNSON, P.R. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum Gene Ther* **10**, 201-213.
- LOEB, J.E., CORDIER, W.S., HARRIS, M.E., WEITZMAN, M.D., and HOPE, T.J. (1999). Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**, 2295-2305.
- LOFQVIST, T., NILSSON, I.M., BERNTORP, E., and PETTERSSON, H. (1997). Haemophilia prophylaxis in young patients--a long-term follow-up. *J Intern Med* **241**, 395-400.
- LOWENSTEIN, P.R. (1997). Why are we doing so much cancer gene therapy? Disentangling the scientific basis from the origins of gene therapy. *Gene Ther* **4**, 755-756.
- LOWENSTEIN, P.R. (2002). Immunology of viral-vector-mediated gene transfer into the brain: an evolutionary and developmental perspective. *Trends Immunol* **23**, 23-30.
- LUTZKO, C., KRUTH, S., ABRAMS-OGG, A.C., LAU, K., LI, L., CLARK, B.R., RUEDY, C., NANJI, S., FOSTER, R., KOHN, D., SHULL, R., and DUBE, I.D. (1999a). Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility in canine alpha-L-iduronidase deficiency. *Blood* **93**, 1895-1905.
- LUTZKO, C., OMORI, F., ABRAMS-OGG, A.C., SHULL, R., LI, L., LAU, K., RUEDY, C., NANJI, S., GARTLEY, C., DOBSON, H., FOSTER, R., KRUTH, S., and DUBE, I.D. (1999b). Gene therapy for canine alpha-L-iduronidase deficiency: in utero adoptive transfer of genetically corrected hematopoietic progenitors results in engraftment but not amelioration of disease. *Hum Gene Ther* **10**, 1521-1532.
- MAH, C., QING, K., KHUNTIRAT, B., PONNAZHAGAN, S., WANG, X.S., KUBE, D.M., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J Virol* **72**, 9835-9843.
- MAIRE, I. (2001). Is genotype determination useful in predicting the clinical phenotype in lysosomal storage diseases? *J Inher Metab Dis* **24 Suppl 2**, 57-61; discussion 45-56.
- MALIK, P., MCQUISTON, S.A., YU, X.J., PEPPER, K.A., KRALL, W.J., PODSAKOFF, G.M., KURTZMAN, G.J., and KOHN, D.B. (1997). Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J Virol* **71**, 1776-1783.
- MANDEL, R.J., and BURGER, C. (2004). Clinical trials in neurological disorders using AAV vectors: promises and challenges. *Curr Opin Mol Ther* **6**, 482-490.
- MANDEL, R.J., GAGE, F.H., CLEVENGER, D.G., SPRATT, S.K., SNYDER, R.O., and LEFF, S.E. (1999). Nerve growth factor expressed in the medial septum following in vivo gene delivery using a recombinant adeno-associated viral vector protects cholinergic neurons from fimbria-fornix lesion-induced degeneration. *Exp Neurol* **155**, 59-64.
- MANDEL, R.J., MANFREDSSON, F.P., FOUST, K.D., RISING, A., REIMSNIDER, S., NASH, K., and BURGER, C. (2006). Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. *Mol Ther* **13**, 463-483.
- MANDEL, R.J., RENDAHL, K.G., SPRATT, S.K., SNYDER, R.O., COHEN, L.K., and LEFF, S.E. (1998). Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **18**, 4271-4284.
- MANDEL, R.J., SPRATT, S.K., SNYDER, R.O., and LEFF, S.E. (1997). Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-

- induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14083-14088.
- MANNING, W.C., ZHOU, S., BLAND, M.P., ESCOBEDO, J.A., and DWARKI, V. (1998). Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 477-485.
- MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**, 2963-2972.
- MANNO, C.S., PIERCE, G.F., ARRUDA, V.R., GLADER, B., RAGNI, M., RASKO, J.J., OZELO, M.C., HOOTS, K., BLATT, P., KONKLE, B., DAKE, M., KAYE, R., RAZAVI, M., ZAJKO, A., ZEHNDER, J., RUSTAGI, P.K., NAKAI, H., CHEW, A., LEONARD, D., WRIGHT, J.F., LESSARD, R.R., SOMMER, J.M., TIGGES, M., SABATINO, D., LUK, A., JIANG, H., MINGOZZI, F., COUTO, L., ERTL, H.C., HIGH, K.A., and KAY, M.A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**, 342-347.
- MASTAKOV, M.Y., BAER, K., KOTIN, R.M., and DURING, M.J. (2002a). Recombinant adeno-associated virus serotypes 2- and 5-mediated gene transfer in the mammalian brain: quantitative analysis of heparin co-infusion. *Mol Ther* **5**, 371-380.
- MASTAKOV, M.Y., BAER, K., SYMES, C.W., LEICHTLEIN, C.B., KOTIN, R.M., and DURING, M.J. (2002b). Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *J Virol* **76**, 8446-8454.
- MASTAKOV, M.Y., BAER, K., XU, R., FITZSIMONS, H., and DURING, M.J. (2001). Combined injection of rAAV with mannitol enhances gene expression in the rat brain. *Mol Ther* **3**, 225-232.
- MAYOR, H.D., and MELNICK, J.L. (1966). Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (picodnavirus group). *Nature* **210**, 331-332.
- MCCARTY, D.M., FU, H., MONAHAN, P.E., TOULSON, C.E., NAIK, P., and SAMULSKI, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10**, 2112-2118.
- MCCARTY, D.M., MONAHAN, P.E., and SAMULSKI, R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8**, 1248-1254.
- MCCARTY, D.M., YOUNG, S.M., JR., and SAMULSKI, R.J. (2004). Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* **38**, 819-845.
- MCCOWN, T.J. (2005). Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* **5**, 333-338.
- MCCOWN, T.J., XIAO, X., LI, J., BREESE, G.R., and SAMULSKI, R.J. (1996). Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* **713**, 99-107.
- MCGEE SANFTNER, L.H., RENDAHL, K.G., QUIROZ, D., COYNE, M., LADNER, M., MANNING, W.C., and FLANNERY, J.G. (2001). Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol Ther* **3**, 688-696.
- MCLAUGHLIN, S.K., COLLIS, P., HERMONAT, P.L., and MUZYCZKA, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* **62**, 1963-1973.

- MCPHEE, S.W., JANSON, C.G., LI, C., SAMULSKI, R.J., CAMP, A.S., FRANCIS, J., SHERA, D., LIOUTERMANN, L., FEELY, M., FREESE, A., and LEONE, P. (2006). Immune responses to AAV in a phase I study for Canavan disease. *J Gene Med* **8**, 577-588.
- MEERTENS, L., ZHAO, Y., ROSIC-KABLAR, S., LI, L., CHAN, K., DOBSON, H., GARTLEY, C., LUTZKO, C., HOPWOOD, J., KOHN, D., KRUTH, S., HOUGH, M.R., and DUBE, I.D. (2002). In utero injection of alpha-L-iduronidase-carrying retrovirus in canine mucopolysaccharidosis type I: infection of multiple tissues and neonatal gene expression. *Hum Gene Ther* **13**, 1809-1820.
- MEIKLE, P.J., BROOKS, D.A., RAVENSCROFT, E.M., YAN, M., WILLIAMS, R.E., JAUNZEMS, A.E., CHATAWAY, T.K., KARAGEORGOS, L.E., DAVEY, R.C., BOULTER, C.D., CARLSSON, S.R., and HOPWOOD, J.J. (1997). Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem* **43**, 1325-1335.
- MEIKLE, P.J., HOPWOOD, J.J., CLAGUE, A.E., and CAREY, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* **281**, 249-254.
- MELNICK, J.L., MAYOR, H.D., SMITH, K.O., and RAPP, F. (1965). Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *J Bacteriol* **90**, 271-274.
- MENON, K.P., TIEU, P.T., and NEUFELD, E.F. (1992). Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. *Genomics* **14**, 763-768.
- MIAO, C.H., SNYDER, R.O., SCHOWALTER, D.B., PATIJN, G.A., DONAHUE, B., WINTHER, B., and KAY, M.A. (1998). The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet* **19**, 13-15.
- MOCHIZUKI, H., HAYAKAWA, H., MIGITA, M., SHIBATA, M., TANAKA, R., SUZUKI, A., SHIMO-NAKANISHI, Y., URABE, T., YAMADA, M., TAMAYOSE, K., SHIMADA, T., MIURA, M., and MIZUNO, Y. (2001). An AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10918-10923.
- MOCHIZUKI, H., MIURA, M., SHIMADA, T., and MIZUNO, Y. (2002). Adeno-associated virus-mediated antiapoptotic gene delivery: in vivo gene therapy for neurological disorders. *Methods* **28**, 248-252.
- MOLLARD, R.J., TELEGAN, P., HASKINS, M., and AGUIRRE, G. (1996). Corneal endothelium in mucopolysaccharide storage disorders. Morphologic studies in animal models. *Cornea* **15**, 25-34.
- MONAHAN, P.E., and SAMULSKI, R.J. (2000). AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* **7**, 24-30.
- MORI, S., WANG, L., TAKEUCHI, T., and KANDA, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* **330**, 375-383.
- MORRISON, P.F., LASKE, D.W., BOBO, H., OLDFIELD, E.H., and DEDRICK, R.L. (1994). High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* **266**, R292-305.
- MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B.A., SNYDER, R.O., MCARTHUR, J.G., and PATEL, S.D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* **74**, 1761-1766.
- MOSS, R.B., RODMAN, D., SPENCER, L.T., AITKEN, M.L., ZEITLIN, P.L., WALTZ, D., MILLA, C., BRODY, A.S., CLANCY, J.P., RAMSEY, B., HAMBLETT, N., and HEALD, A.E. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated

- cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* **125**, 509-521.
- MULDOON, L.L., NILAVER, G., KROLL, R.A., PAGEL, M.A., BREAKFIELD, X.O., CHIOCCA, E.A., DAVIDSON, B.L., WEISSLEDER, R., and NEUWELT, E.A. (1995). Comparison of intracerebral inoculation and osmotic blood-brain barrier disruption for delivery of adenovirus, herpesvirus, and iron oxide particles to normal rat brain. *Am J Pathol* **147**, 1840-1851.
- MULLER, O.J., KAUL, F., WEITZMAN, M.D., PASQUALINI, R., ARAP, W., KLEINSCHMIDT, J.A., and TREPEL, M. (2003). Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol* **21**, 1040-1046.
- MURAMATSU, S., FUJIMOTO, K., Ikeguchi, K., SHIZUMA, N., KAWASAKI, K., ONO, F., SHEN, Y., WANG, L., MIZUKAMI, H., KUME, A., MATSUMURA, M., NAGATSU, I., URANO, F., ICHINOSE, H., NAGATSU, T., TERAOKA, K., NAKANO, I., and OZAWA, K. (2002). Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* **13**, 345-354.
- MYEROWITZ, R., and NEUFELD, E.F. (1981). Maturation of alpha-L-iduronidase in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* **256**, 3044-3048.
- NAKAI, H., FUESS, S., STORM, T.A., MEUSE, L.A., and KAY, M.A. (2003). Free DNA ends are essential for concatemerization of synthetic double-stranded adeno-associated virus vector genomes transfected into mouse hepatocytes in vivo. *Mol Ther* **7**, 112-121.
- NAKAI, H., FUESS, S., STORM, T.A., MURAMATSU, S., NARA, Y., and KAY, M.A. (2005). Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol* **79**, 214-224.
- NAKAI, H., IWAKI, Y., KAY, M.A., and COUTO, L.B. (1999). Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol* **73**, 5438-5447.
- NAKAI, H., STORM, T.A., and KAY, M.A. (2000a). Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol* **18**, 527-532.
- NAKAI, H., STORM, T.A., and KAY, M.A. (2000b). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* **74**, 9451-9463.
- NAKAI, H., YANT, S.R., STORM, T.A., FUESS, S., MEUSE, L., and KAY, M.A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* **75**, 6969-6976.
- NATOWICZ, M.R., CHI, M.M., LOWRY, O.H., and SLY, W.S. (1979). Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4322-4326.
- NGUYEN, J.B., SANCHEZ-PERNAUTE, R., CUNNINGHAM, J., and BANKIEWICZ, K.S. (2001). Convection-enhanced delivery of AAV-2 combined with heparin increases TK gene transfer in the rat brain. *Neuroreport* **12**, 1961-1964.
- NIWA, H., YAMAMURA, K., and MIYAZAKI, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.
- NO, D., YAO, T.P., and EVANS, R.M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3346-3351.

- NONY, P., CHADEUF, G., TESSIER, J., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2003). Evidence for packaging of rep-cap sequences into adeno-associated virus (AAV) type 2 capsids in the absence of inverted terminal repeats: a model for generation of rep-positive AAV particles. *J Virol* **77**, 776-781.
- NONY, P., TESSIER, J., CHADEUF, G., WARD, P., GIRAUD, A., DUGAST, M., LINDEN, R.M., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2001). Novel cis-acting replication element in the adeno-associated virus type 2 genome is involved in amplification of integrated rep-cap sequences. *J Virol* **75**, 9991-9994.
- NUTT, J.G., BURCHIEL, K.J., COMELLA, C.L., JANKOVIC, J., LANG, A.E., LAWS, E.R., JR., LOZANO, A.M., PENN, R.D., SIMPSON, R.K., JR., STACY, M., and WOOTEN, G.F. (2003). Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* **60**, 69-73.
- OHMI, K., GREENBERG, D.S., RAJAVEL, K.S., RYAZANTSEV, S., LI, H.H., and NEUFELD, E.F. (2003). Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1902-1907.
- OKUN, M.M., ESKRIDGE, E.M., and SHIELDS, D. (1990). Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **265**, 7478-7484.
- OSTEDGAARD, L.S., ROKHLINA, T., KARP, P.H., LASHMIT, P., AFIONE, S., SCHMIDT, M., ZABNER, J., STINSKI, M.F., CHIORINI, J.A., and WELSH, M.J. (2005). A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2952-2957.
- OUMESMAR, B.N., VIGNAIS, L., and BARON-VAN EVERCOOREN, A. (1997). Developmental expression of platelet-derived growth factor alpha-receptor in neurons and glial cells of the mouse CNS. *J Neurosci* **17**, 125-139.
- OZAWA, K., FAN, D.S., SHEN, Y., MURAMATSU, S., FUJIMOTO, K., IKEGUCHI, K., OGAWA, M., URABE, M., KUME, A., and NAKANO, I. (2000). Gene therapy of Parkinson's disease using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J Neural Transm Suppl*, 181-191.
- PARKS, W.P., BOUCHER, D.W., MELNICK, J.L., TABER, L.H., and YOW, M.D. (1970). Seroepidemiological and Ecological Studies of the Adenovirus-Associated Satellite Viruses. *Infect Immun* **2**, 716-722.
- PASSINI, M.A., LEE, E.B., HEUER, G.G., and WOLFE, J.H. (2002). Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream. *J Neurosci* **22**, 6437-6446.
- PASSINI, M.A., WATSON, D.J., VITE, C.H., LANDSBURG, D.J., FEIGENBAUM, A.L., and WOLFE, J.H. (2003). Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol* **77**, 7034-7040.
- PASSINI, M.A., and WOLFE, J.H. (2001). Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector. *J Virol* **75**, 12382-12392.
- PATERNA, J.C., FELDON, J., and BUELER, H. (2004). Transduction profiles of recombinant adeno-associated virus vectors derived from serotypes 2 and 5 in the nigrostriatal system of rats. *J Virol* **78**, 6808-6817.
- PATERNA, J.C., MOCCETTI, T., MURA, A., FELDON, J., and BUELER, H. (2000). Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther* **7**, 1304-1311.

- PEDEN, C.S., BURGER, C., MUZYCZKA, N., and MANDEL, R.J. (2004). Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol* **78**, 6344-6359.
- PEEL, A.L., and KLEIN, R.L. (2000). Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS. *J Neurosci Methods* **98**, 95-104.
- PEEL, A.L., ZOLOTUKHIN, S., SCHRIMSHER, G.W., MUZYCZKA, N., and REIER, P.J. (1997). Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther* **4**, 16-24.
- PELLED, D., LLOYD-EVANS, E., RIEBELING, C., JEYAKUMAR, M., PLATT, F.M., and FUTERMAN, A.H. (2003). Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with N-butyldeoxynojirimycin. *J Biol Chem* **278**, 29496-29501.
- PERABO, L., BUNING, H., KOFLER, D.M., RIED, M.U., GIROD, A., WENDTNER, C.M., ENSSLE, J., and HALLEK, M. (2003). In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* **8**, 151-157.
- PEREIRA, D.J., MCCARTY, D.M., and MUZYCZKA, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* **71**, 1079-1088.
- PERUTZ, M.F. (1995). Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Mol Med* **1**, 718-721.
- PHILPOTT, N.J., GOMOS, J., BERNS, K.I., and FALCK-PEDERSEN, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12381-12385.
- POLYMERPOULOS, M.H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S.E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E.S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W.G., LAZZARINI, A.M., DUVOISIN, R.C., DI IORIO, G., GOLBE, L.I., and NUSSBAUM, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047.
- PONNAZHAGAN, S., MAHENDRA, G., KUMAR, S., THOMPSON, J.A., and CASTILLAS, M., JR. (2002). Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J Virol* **76**, 12900-12907.
- PONNAZHAGAN, S., MUKHERJEE, P., WANG, X.S., QING, K., KUBE, D.M., MAH, C., KURPAD, C., YODER, M.C., SROUR, E.F., and SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction in primary human bone marrow-derived CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: donor variation and correlation of transgene expression with cellular differentiation. *J Virol* **71**, 8262-8267.
- PROIA, R.L., and WU, Y.P. (2004). Blood to brain to the rescue. *J Clin Invest* **113**, 1108-1110.
- PROSCH, S., STEIN, J., STAAK, K., LIEBENTHAL, C., VOLK, H.D., and KRUGER, D.H. (1996). Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 195-201.
- PROVOST, N., LE MEUR, G., WEBER, M., MENDES-MADEIRA, A., PODEVIN, G., CHEREL, Y., COLLE, M.A., DESCHAMPS, J.Y., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration:

- evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* **11**, 275-283.
- PURPURA, D.P., and SUZUKI, K. (1976). Distortion of neuronal geometry and formation of aberrant synapses in neuronal storage disease. *Brain Res* **116**, 1-21.
- QING, K., KHUNTIRAT, B., MAH, C., KUBE, D.M., WANG, X.S., PONNAZHAGAN, S., ZHOU, S., DWARKI, V.J., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* **72**, 1593-1599.
- QING, K., MAH, C., HANSEN, J., ZHOU, S., DWARKI, V., and SRIVASTAVA, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**, 71-77.
- QING, K., WANG, X.S., KUBE, D.M., PONNAZHAGAN, S., BAJPAI, A., and SRIVASTAVA, A. (1997). Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10879-10884.
- RABINOWITZ, J.E., BOWLES, D.E., FAUST, S.M., LEDFORD, J.G., CUNNINGHAM, S.E., and SAMULSKI, R.J. (2004). Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J Virol* **78**, 4421-4432.
- RABINOWITZ, J.E., ROLLING, F., LI, C., CONRATH, H., XIAO, W., XIAO, X., and SAMULSKI, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76**, 791-801.
- RAVIKUMAR, B., DUDEN, R., and RUBINSZTEIN, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* **11**, 1107-1117.
- REN, C., KUMAR, S., SHAW, D.R., and PONNAZHAGAN, S. (2005). Genomic stability of self-complementary adeno-associated virus 2 during early stages of transduction in mouse muscle in vivo. *Hum Gene Ther* **16**, 1047-1057.
- RICHICHI, C., LIN, E.J., STEFANIN, D., COLELLA, D., RAVIZZA, T., GRIGNASCHI, G., VEGLIANESE, P., SPERK, G., DURING, M.J., and VEZZANI, A. (2004). Anticonvulsant and antiepileptogenic effects mediated by adeno-associated virus vector neuropeptide Y expression in the rat hippocampus. *J Neurosci* **24**, 3051-3059.
- RIED, M.U., GIROD, A., LEIKE, K., BUNING, H., and HALLEK, M. (2002). Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol* **76**, 4559-4566.
- RIVERA, V.M., CLACKSON, T., NATESAN, S., POLLOCK, R., AMARA, J.F., KEENAN, T., MAGARI, S.R., PHILLIPS, T., COURAGE, N.L., CERASOLI, F., JR., HOLT, D.A., and GILMAN, M. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* **2**, 1028-1032.
- RODRIGUEZ-LEBRON, E., DENOVAR-WRIGHT, E.M., NASH, K., LEWIN, A.S., and MANDEL, R.J. (2005). Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* **12**, 618-633.
- ROISEN, F.J., BARTFELD, H., NAGELE, R., and YORKE, G. (1981). Ganglioside stimulation of axonal sprouting in vitro. *Science* **214**, 577-578.
- ROSENBLAD, C., KIRIK, D., DEVAUX, B., MOFFAT, B., PHILLIPS, H.S., and BJORKLUND, A. (1999). Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons

- by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* **11**, 1554-1566.
- ROSS, C.J., RALPH, M., and CHANG, P.L. (2000). Somatic gene therapy for a neurodegenerative disease using microencapsulated recombinant cells. *Exp Neurol* **166**, 276-286.
- RUSSELL, C., HENDSON, G., JEVON, G., MATLOCK, T., YU, J., AKLUJKAR, M., NG, K.Y., and CLARKE, L.A. (1998). Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* **53**, 349-361.
- RUSSELL, D.W., and KAY, M.A. (1999). Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood* **94**, 864-874.
- RUTLEDGE, E.A., HALBERT, C.L., and RUSSELL, D.W. (1998). Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J Virol* **72**, 309-319.
- SALVETTI, A., OREVE, S., CHADEUF, G., FAVRE, D., CHEREL, Y., CHAMPION-ARNAUD, P., DAVID-AMELINE, J., and MOULLIER, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**, 695-706.
- SANCHEZ-PERNAUTE, R., HARVEY-WHITE, J., CUNNINGHAM, J., and BANKIEWICZ, K.S. (2001). Functional effect of adeno-associated virus mediated gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase into the striatum of 6-OHDA-lesioned rats. *Mol Ther* **4**, 324-330.
- SANDHOFF, K., and VAN ECHTEN, G. (1993). Ganglioside metabolism--topology and regulation. *Adv Lipid Res* **26**, 119-142.
- SANFTNER, L.M., SUZUKI, B.M., DOROUDCHI, M.M., FENG, L., MCCLELLAND, A., FORSAYETH, J.R., and CUNNINGHAM, J. (2004). Striatal delivery of rAAV-hAADC to rats with preexisting immunity to AAV. *Mol Ther* **9**, 403-409.
- SARKAR, R., MUCCI, M., ADDYA, S., TETREAULT, R., BELLINGER, D.A., NICHOLS, T.C., and KAZAZIAN, H.H., JR. (2006). Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. *Hum Gene Ther* **17**, 427-439.
- SASAHARA, M., SATO, H., IIHARA, K., WANG, J., CHUE, C.H., TAKAYAMA, S., HAYASE, Y., and HAZAMA, F. (1995). Expression of platelet-derived growth factor B-chain in the mature rat brain and pituitary gland. *Brain Res Mol Brain Res* **32**, 63-74.
- SCHERZINGER, E., SITTler, A., SCHWEIGER, K., HEISER, V., LURZ, R., HASENBANK, R., BATES, G.P., LEHRACH, H., and WANKER, E.E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4604-4609.
- SCHMIDT, M., GROT, E., CERVENKA, P., WAINER, S., BUCK, C., and CHIORINI, J.A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* **80**, 5082-5085.
- SCHNEPP, B.C., JENSEN, R.L., CHEN, C.L., JOHNSON, P.R., and CLARK, K.R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* **79**, 14793-14803.
- SCOTT, H.S., ANSON, D.S., ORSBORN, A.M., NELSON, P.V., CLEMENTS, P.R., MORRIS, C.P., and HOPWOOD, J.J. (1991). Human alpha-L-iduronidase: cDNA isolation and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9695-9699.
- SCOTT, H.S., ASHTON, L.J., EYRE, H.J., BAKER, E., BROOKS, D.A., CALLEN, D.F., SUTHERLAND, G.R., MORRIS, C.P., and HOPWOOD, J.J. (1990). Chromosomal

- localization of the human alpha-L-iduronidase gene (IDUA) to 4p16.3. *Am J Hum Genet* **47**, 802-807.
- SCOTT, H.S., LITJENS, T., NELSON, P.V., BROOKS, D.A., HOPWOOD, J.J., and MORRIS, C.P. (1992). alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum Mutat* **1**, 333-339.
- SEISENBERGER, G., RIED, M.U., ENDRESS, T., BUNING, H., HALLEK, M., and BRAUCHLE, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**, 1929-1932.
- SELKOE, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23-31.
- SHEN, Y., MURAMATSU, S.I., IKEGUCHI, K., FUJIMOTO, K.I., FAN, D.S., OGAWA, M., MIZUKAMI, H., URABE, M., KUME, A., NAGATSU, I., URANO, F., SUZUKI, T., ICHINOSE, H., NAGATSU, T., MONAHAN, J., NAKANO, I., and OZAWA, K. (2000). Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* **11**, 1509-1519.
- SHINNAR, S., SINGER, H.S., and VALLE, D. (1982). Acute hydrocephalus Hurler's syndrome. *Am J Dis Child* **136**, 556-557.
- SHULL, R.M., HELMAN, R.G., SPELLACY, E., CONSTANTOPOULOS, G., MUNGER, R.J., and NEUFELD, E.F. (1984). Morphologic and biochemical studies of canine mucopolysaccharidosis I. *Am J Pathol* **114**, 487-495.
- SHULL, R.M., KAKKIS, E.D., MCENTEE, M.F., KANIA, S.A., JONAS, A.J., and NEUFELD, E.F. (1994). Enzyme replacement in a canine model of Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12937-12941.
- SHULL, R.M., MUNGER, R.J., SPELLACY, E., HALL, C.W., CONSTANTOPOULOS, G., and NEUFELD, E.F. (1982). Canine alpha-L-iduronidase deficiency. A model of mucopolysaccharidosis I. *Am J Pathol* **109**, 244-248.
- SNYDER, R.O. (1999). Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med* **1**, 166-175.
- SNYDER, R.O., and FLOTTE, T.R. (2002). Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 418-423.
- SNYDER, R.O., MIAO, C.H., PATIJN, G.A., SPRATT, S.K., DANOS, O., NAGY, D., GOWN, A.M., WINTHER, B., MEUSE, L., COHEN, L.K., THOMPSON, A.R., and KAY, M.A. (1997a). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* **16**, 270-276.
- SNYDER, R.O., SPRATT, S.K., LAGARDE, C., BOHL, D., KASPAR, B., SLOAN, B., COHEN, L.K., and DANOS, O. (1997b). Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* **8**, 1891-1900.
- SONG, S., EMBURY, J., LAIPIS, P.J., BERNS, K.I., CRAWFORD, J.M., and FLOTTE, T.R. (2001). Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* **8**, 1299-1306.
- SONG, S., SCOTT-JORGENSEN, M., WANG, J., POIRIER, A., CRAWFORD, J., CAMPBELL-THOMPSON, M., and FLOTTE, T.R. (2002). Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 alpha-1 antitrypsin (rAAV-SERPINA1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects. *Mol Ther* **6**, 329-335.

- SPELLACY, E., SHULL, R.M., CONSTANTOPOULOS, G., and NEUFELD, E.F. (1983). A canine model of human alpha-L-iduronidase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6091-6095.
- STABA, S.L., ESCOLAR, M.L., POE, M., KIM, Y., MARTIN, P.L., SZABOLCS, P., ALLISON-THACKER, J., WOOD, S., WENGER, D.A., RUBINSTEIN, P., HOPWOOD, J.J., KRIVIT, W., and KURTZBERG, J. (2004). Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med* **350**, 1960-1969.
- STEWART, P.A., and HAYAKAWA, E.M. (1987). Interendothelial junctional changes underlie the developmental 'tightening' of the blood-brain barrier. *Brain Res* **429**, 271-281.
- STOLTZFUS, L.J., SOSA-PINEDA, B., MOSKOWITZ, S.M., MENON, K.P., DLOTT, B., HOOPER, L., TELOW, D.B., SHULL, R.M., and NEUFELD, E.F. (1992). Cloning and characterization of cDNA encoding canine alpha-L-iduronidase. mRNA deficiency in mucopolysaccharidosis I dog. *J Biol Chem* **267**, 6570-6575.
- SUMMERFORD, C., BARTLETT, J.S., and SAMULSKI, R.J. (1999). AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**, 78-82.
- SUMMERFORD, C., and SAMULSKI, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**, 1438-1445.
- SUN, J.Y., ANAND-JAWA, V., CHATTERJEE, S., and WONG, K.K. (2003). Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther* **10**, 964-976.
- SUN, L., LI, J., and XIAO, X. (2000). Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med* **6**, 599-602.
- TAYLOR, J.A., GIBSON, G.J., BROOKS, D.A., and HOPWOOD, J.J. (1991). alpha-L-iduronidase in normal and mucopolysaccharidosis-type-I human skin fibroblasts. *Biochem J* **274** (Pt 1), 263-268.
- TENENBAUM, L., JURYSTA, F., STATHOPOULOS, A., PUSCHBAN, Z., MELAS, C., HERMENS, W.T., VERHAAGEN, J., PICHON, B., VELU, T., and LEVIVIER, M. (2000). Tropism of AAV-2 vectors for neurons of the globus pallidus. *Neuroreport* **11**, 2277-2283.
- TENENBAUM, L., LEHTONEN, E., and MONAHAN, P.E. (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* **3**, 545-565.
- TESSIER, J., CHADEUF, G., NONY, P., AVET-LOISEAU, H., MOULLIER, P., and SALVETTI, A. (2001). Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus rep-cap sequences. *J Virol* **75**, 375-383.
- THOMAS, C.E., EHRHARDT, A., and KAY, M.A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**, 346-358.
- THOMAS, C.E., STORM, T.A., HUANG, Z., and KAY, M.A. (2004). Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* **78**, 3110-3122.
- THOMPSON, T.E., and TILLACK, T.W. (1985). Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **14**, 361-386.
- TIMPE, J., BEVINGTON, J., CASPER, J., DIGNAM, J.D., and TREMPER, J.P. (2005). Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther* **5**, 273-284.

- TURNER, C.T., HOPWOOD, J.J., and BROOKS, D.A. (2000). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis I: altered distribution and targeting of alpha-L-iduronidase in immunized rats. *Mol Genet Metab* **69**, 277-285.
- TURPIE, A.G., GALLUS, A.S., and HOEK, J.A. (2001). A synthetic pentasaccharide for the prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement. *N Engl J Med* **344**, 619-625.
- VAN AERDE, J., and CAMPBELL, A. (1983). Hydrocephalus and shunt placement. *Am J Dis Child* **137**, 187-188.
- VERMA, I.M., and WEITZMAN, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**, 711-738.
- VIRELLA-LOWELL, I., ZUSMAN, B., FOUST, K., LOILER, S., CONLON, T., SONG, S., CHESNUT, K.A., FERKOL, T., and FLOTTE, T.R. (2005). Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* **7**, 842-850.
- VITE, C.H., MCGOWAN, J.C., NIOGI, S.N., PASSINI, M.A., DROBATZ, K.J., HASKINS, M.E., and WOLFE, J.H. (2005). Effective gene therapy for an inherited CNS disease in a large animal model. *Ann Neurol* **57**, 355-364.
- VITE, C.H., PASSINI, M.A., HASKINS, M.E., and WOLFE, J.H. (2003). Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther* **10**, 1874-1881.
- VOGLER, C., GALVIN, N., LEVY, B., GRUBB, J., JIANG, J., ZHOU, X.Y., and SLY, W.S. (2003). Transgene produces massive overexpression of human beta -glucuronidase in mice, lysosomal storage of enzyme, and strain-dependent tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2669-2673.
- VOGLER, C., LEVY, B., GALVIN, N., SANDS, M.S., BIRKENMEIER, E.H., SLY, W.S., and BARKER, J. (2001). A novel model of murine mucopolysaccharidosis type VII due to an intracisternal a particle element transposition into the beta-glucuronidase gene: clinical and pathologic findings. *Pediatr Res* **49**, 342-348.
- VOGLER, C., SANDS, M., HIGGINS, A., LEVY, B., GRUBB, J., BIRKENMEIER, E.H., and SLY, W.S. (1993). Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis type VII mouse. *Pediatr Res* **34**, 837-840.
- VONSATTEL, J.P., MYERS, R.H., STEVENS, T.J., FERRANTE, R.J., BIRD, E.D., and RICHARDSON, E.P., JR. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-577.
- WADA, R., TIFFT, C.J., and PROIA, R.L. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10954-10959.
- WAGNER, J.A., MESSNER, A.H., MORAN, M.L., DAIFUKU, R., KOUYAMA, K., DESCH, J.K., MANLEY, S., NORBASH, A.M., CONRAD, C.K., FRIBORG, S., REYNOLDS, T., GUGGINO, W.B., MOSS, R.B., CARTER, B.J., WINE, J.J., FLOTTE, T.R., and GARDNER, P. (1999). Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *Laryngoscope* **109**, 266-274.
- WAGNER, J.A., MORAN, M.L., MESSNER, A.H., DAIFUKU, R., CONRAD, C.K., REYNOLDS, T., GUGGINO, W.B., MOSS, R.B., CARTER, B.J., WINE, J.J., FLOTTE, T.R., and GARDNER, P. (1998a). A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* **9**, 889-909.
- WAGNER, J.A., NEPOMUCENO, I.B., MESSNER, A.H., MORAN, M.L., BATSON, E.P., DIMICELI, S., BROWN, B.W., DESCH, J.K., NORBASH, A.M., CONRAD, C.K., GUGGINO, W.B., FLOTTE, T.R., WINE, J.J., CARTER, B.J., REYNOLDS, T.C., MOSS, R.B., and GARDNER, P. (2002). A phase II, double-blind, randomized,

- placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther* **13**, 1349-1359.
- WAGNER, J.A., REYNOLDS, T., MORAN, M.L., MOSS, R.B., WINE, J.J., FLOTTE, T.R., and GARDNER, P. (1998b). Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* **351**, 1702-1703.
- WALKLEY, S.U. (1998). Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain Pathol* **8**, 175-193.
- WALKLEY, S.U. (2003). Neurobiology and cellular pathogenesis of glycolipid storage diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 893-904.
- WALKLEY, S.U., BAKER, H.J., RATTAZZI, M.C., HASKINS, M.E., and WU, J.Y. (1991). Neuroaxonal dystrophy in neuronal storage disorders: evidence for major GABAergic neuron involvement. *J Neurol Sci* **104**, 1-8.
- WALTERS, R.W., YI, S.M., KESHAVJEE, S., BROWN, K.E., WELSH, M.J., CHIORINI, J.A., and ZABNER, J. (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* **276**, 20610-20616.
- WANG, C., WANG, C.M., CLARK, K.R., and SFERRA, T.J. (2003). Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther* **10**, 1528-1534.
- WANG, L., MURAMATSU, S., LU, Y., IKEGUCHI, K., FUJIMOTO, K., OKADA, T., MIZUKAMI, H., HANAZONO, Y., KUME, A., URANO, F., ICHINOSE, H., NAGATSU, T., NAKANO, I., and OZAWA, K. (2002). Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* **9**, 381-389.
- WANG, L., TAKABE, K., BIDLINGMAIER, S.M., ILL, C.R., and VERMA, I.M. (1999). Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3906-3910.
- WANG, X.S., KHUNTIRAT, B., QING, K., PONNAZHAGAN, S., KUBE, D.M., ZHOU, S., DWARKI, V.J., and SRIVASTAVA, A. (1998). Characterization of wild-type adeno-associated virus type 2-like particles generated during recombinant viral vector production and strategies for their elimination. *J Virol* **72**, 5472-5480.
- WANG, X.S., PONNAZHAGAN, S., and SRIVASTAVA, A. (1996). Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol* **70**, 1668-1677.
- WANG, X.S., QING, K., PONNAZHAGAN, S., and SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus type 2 DNA replication in vivo: mutation analyses of the D sequence in viral inverted terminal repeats. *J Virol* **71**, 3077-3082.
- WANG, Y., O'MALLEY, B.W., JR., TSAI, S.Y., and O'MALLEY, B.W. (1994). A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8180-8184.
- WANG, Z., ZHU, T., QIAO, C., ZHOU, L., WANG, B., ZHANG, J., CHEN, C., LI, J., and XIAO, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**, 321-328.
- WARD, P., DEAN, F.B., O'DONNELL, M.E., and BERNS, K.I. (1998). Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* **72**, 420-427.
- WARD, P., URCELAY, E., KOTIN, R., SAFER, B., and BERNS, K.I. (1994). Adeno-associated virus DNA replication in vitro: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein. *J Virol* **68**, 6029-6037.
- WARRINGTON, K.H., JR., and HERZOG, R.W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* **119**, 571-603.

- WATSON, D.J., PASSINI, M.A., and WOLFE, J.H. (2005). Transduction of the choroid plexus and ependyma in neonatal mouse brain by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped lentivirus and adeno-associated virus type 5 vectors. *Hum Gene Ther* **16**, 49-56.
- WATSON, G., BASTACKY, J., BELICHENKO, P., BUDDHIKOT, M., JUNGLES, S., VELLARD, M., MOBLEY, W.C., and KAKKIS, E. (2006). Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice. *Gene Ther* **13**, 917-925.
- WEBER, M., RABINOWITZ, J., PROVOST, N., CONRATH, H., FOLLIOT, S., BRIOT, D., CHEREL, Y., CHENUAUD, P., SAMULSKI, J., MOULLIER, P., and ROLLING, F. (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* **7**, 774-781.
- WELSH, M.J., and SMITH, A.E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254.
- WILLIAMS, L.R., VARON, S., PETERSON, G.M., WICTORIN, K., FISCHER, W., BJORKLUND, A., and GAGE, F.H. (1986). Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9231-9235.
- WINCHESTER, B. (2001). Are there useful biochemical markers of disease activity in lysosomal storage diseases? *J Inherit Metab Dis* **24 Suppl 2**, 52-56; discussion 45-56.
- WISTUBA, A., KERN, A., WEGER, S., GRIMM, D., and KLEINSCHMIDT, J.A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* **71**, 1341-1352.
- WOBUS, C.E., HUGLE-DORR, B., GIROD, A., PETERSEN, G., HALLEK, M., and KLEINSCHMIDT, J.A. (2000). Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol* **74**, 9281-9293.
- WOLFE, J.H., SANDS, M.S., BARKER, J.E., GWYNN, B., ROWE, L.B., VOGLER, C.A., and BIRKENMEIER, E.H. (1992). Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* **360**, 749-753.
- WOLFF, J., LEWIS, D.L., HERWEIJER, H., HEGGE, J., and HAGSTROM, J. (2005). Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol* **24**, 202-208.
- WRAITH, E.J., HOPWOOD, J.J., FULLER, M., MEIKLE, P.J., and BROOKS, D.A. (2005). Laronidase treatment of mucopolysaccharidosis I. *BioDrugs* **19**, 1-7.
- WRAITH, J.E. (2001). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type I: progress and emerging difficulties. *J Inherit Metab Dis* **24**, 245-250.
- WRAITH, J.E., CLARKE, L.A., BECK, M., KOLODNY, E.H., PASTORES, G.M., MUENZER, J., RAPOPORT, D.M., BERGER, K.I., SWIEDLER, S.J., KAKKIS, E.D., BRAAKMAN, T., CHADBOURNE, E., WALTON-BOWEN, K., and COX, G.F. (2004). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr* **144**, 581-588.
- WU, P., PHILLIPS, M.I., BUI, J., and TERWILLIGER, E.F. (1998). Adeno-associated virus vector-mediated transgene integration into neurons and other nondividing cell targets. *J Virol* **72**, 5919-5926.
- WU, Z., ASOKAN, A., and SAMULSKI, R.J. (2006a). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **14**, 316-327.

- WU, Z., MILLER, E., AGBANDJE-MCKENNA, M., and SAMULSKI, R.J. (2006b). Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* **80**, 9093-9103.
- XIAO, W., CHIRMULE, N., BERTA, S.C., MCCULLOUGH, B., GAO, G., and WILSON, J.M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* **70**, 8098-8108.
- XIAO, X., LI, J., and SAMULSKI, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* **72**, 2224-2232.
- XU, D., MCCARTY, D., FERNANDES, A., FISHER, M., SAMULSKI, R.J., and JULIANO, R.L. (2005). Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Ther* **11**, 523-530.
- XU, L., DALY, T., GAO, C., FLOTTE, T.R., SONG, S., BYRNE, B.J., SANDS, M.S., and PARKER PONDER, K. (2001a). CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum Gene Ther* **12**, 563-573.
- XU, R., JANSON, C.G., MASTAKOV, M., LAWLOR, P., YOUNG, D., MOURAVLEV, A., FITZSIMONS, H., CHOI, K.L., MA, H., DRAGUNOW, M., LEONE, P., CHEN, Q., DICKER, B., and DURING, M.J. (2001b). Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes. *Gene Ther* **8**, 1323-1332.
- XU, Z., YUE, Y., LAI, Y., YE, C., QIU, J., PINTEL, D.J., and DUAN, D. (2004). Trans-splicing adeno-associated viral vector-mediated gene therapy is limited by the accumulation of spliced mRNA but not by dual vector coinfection efficiency. *Hum Gene Ther* **15**, 896-905.
- YAN, Z., ZHANG, Y., DUAN, D., and ENGELHARDT, J.F. (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6716-6721.
- YANG, G.S., SCHMIDT, M., YAN, Z., LINDBLOOM, J.D., HARDING, T.C., DONAHUE, B.A., ENGELHARDT, J.F., KOTIN, R., and DAVIDSON, B.L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* **76**, 7651-7660.
- YANG, Q., MAMOUNAS, M., YU, G., KENNEDY, S., LEAKER, B., MERSON, J., WONG-STAAAL, F., YU, M., and BARBER, J.R. (1998). Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* **9**, 1929-1937.
- YOSHIMURA, M., SAKAMOTO, M., IKEMOTO, M., MOCHIZUKI, Y., YUASA, K., MIYAGOE-SUZUKI, Y., and TAKEDA, S. (2004). AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther* **10**, 821-828.
- YU, R.K., and SAITO, M. (1992). Gangliosides and neuronal-astrocytic interactions. *Prog Brain Res* **94**, 333-338.
- YUAN, W., and PARRISH, C.R. (2001). Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells. *Virology* **279**, 546-557.
- YUASA, K., SAKAMOTO, M., MIYAGOE-SUZUKI, Y., TANOUCHI, A., YAMAMOTO, H., LI, J., CHAMBERLAIN, J.S., XIAO, X., and TAKEDA, S. (2002). Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal

- muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* **9**, 1576-1588.
- YUE, Y., and DUAN, D. (2003). Double strand interaction is the predominant pathway for intermolecular recombination of adeno-associated viral genomes. *Virology* **313**, 1-7.
- ZAISS, A.K., and MURUVE, D.A. (2005). Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* **5**, 323-331.
- ZHANG, J., WU, X., QIN, C., QI, J., MA, S., ZHANG, H., KONG, Q., CHEN, D., BA, D., and HE, W. (2003). A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioral impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **14**, 365-379.
- ZHANG, Y.C., POWERS, M., WASSERFALL, C., BRUSKO, T., SONG, S., FLOTTE, T., SNYDER, R.O., POTTER, M., SCOTT-JORGENSEN, M., CAMPBELL-THOMPSON, M., CRAWFORD, J.M., NICK, H.S., AGARWAL, A., ELLIS, T.M., and ATKINSON, M.A. (2004). Immunity to adeno-associated virus serotype 2 delivered transgenes imparted by genetic predisposition to autoimmunity. *Gene Ther* **11**, 233-240.
- ZHAO, W., ZHONG, L., WU, J., CHEN, L., QING, K., WEIGEL-KELLEY, K.A., LARSEN, S.H., SHOU, W., WARRINGTON, K.H., JR., and SRIVASTAVA, A. (2006). Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *Virology* **353**, 283-293.
- ZHENG, Y., ROZENGURT, N., RYAZANTSEV, S., KOHN, D.B., SATAKE, N., and NEUFELD, E.F. (2003). Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab* **79**, 233-244.
- ZHONG, L., CHEN, L., LI, Y., QING, K., WEIGEL-KELLEY, K.A., CHAN, R.J., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (2004). Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as helper viruses to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro and in vivo. *Mol Ther* **10**, 950-957.
- ZHOU, S.Z., COOPER, S., KANG, L.Y., RUGGIERI, L., HEIMFELD, S., SRIVASTAVA, A., and BROXMEYER, H.E. (1994). Adeno-associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *J Exp Med* **179**, 1867-1875.
- ZOLOTUKHIN, S., POTTER, M., ZOLOTUKHIN, I., SAKAI, Y., LOILER, S., FRAITES, T.J., JR., CHiodo, V.A., PHILLIPSBERG, T., MUZYCZKA, N., HAUSWIRTH, W.W., FLOTTE, T.R., BYRNE, B.J., and SNYDER, R.O. (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* **28**, 158-167.
- ZUFFEREY, R., DONELLO, J.E., TRONO, D., and HOPE, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* **73**, 2886-2892.

Transfert de gène dans le système nerveux central à l'aide de vecteurs recombinants dérivés de l'*Adeno-associated* virus dans un modèle canin de mucopolysaccharidose de type I et chez le primate

Résumé:

Les vecteurs dérivés de l'adéno-associated virus sont particulièrement attractifs pour un transfert de gène à long terme dans le SNC. La mucopolysaccharidose de type I est une maladie de surcharge lysosomale. La forme la plus sévère est caractérisée par des atteintes neurologiques graves pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe. Nous avons évalué le transfert de gène médié par un vecteur AAVr 5 dans le SNC d'un modèle canin MPS I. Quatre injections stéréotaxiques permettent une diffusion du vecteur dans la totalité du SNC avec une correction des lésions de surcharge et des désordres biochimiques. L'efficacité de transduction des sérotypes d'AAV dans le SNC étant principalement évalués chez les rongeurs, nous avons étudié le profil de transduction de 3 sérotypes d'AAVr : AAVr 1, 2 et 5 dans le SNC de primates. L'AAVr 1 permet le transfert de gène le plus efficace dans le SNC de primates. Ces études confirment la faisabilité du transfert de gène dans le SNC d'animaux de grande taille.

Mots clés : Adeno-associated virus, système nerveux central, mucopolysaccharidose de type I, sérotype, primate.

Gene transfer to the brain by AAV vectors in two large animal models : MPS I dog model and non human primate

Abstract:

Adeno-associated viral vectors (AAV) are nonpathogenic for humans and allow for the long term expression of transgenes in the central nervous system (CNS). Mucopolysaccharidosis type I is a lysosomal storage disorder. The most severe form of MPS I is characterised by severe neuronal symptoms. We evaluated the efficacy of gene replacement therapy into the CNS of a canine model of MPS I using an rAAV5 vector. Four stereotaxic injections prevented glycoaminoglycan and secondary ganglioside accumulations. The pattern of transduction of AAV serotypes has been described predominantly in rodents. In addition to this study, we evaluated the transduction pattern of three AAV serotypes after intracerebral injection in the CNS of nonhuman primates: rAAV1, rAAV2, and rAAV5. rAAV1 seems to be the most efficient serotype in the CNS of nonhuman primates. In these studies, we have shown the feasibility of gene therapy with AAV vectors in the brain of large animal models.

Keywords: Adeno-associated virus, central nervous system, MPS I, serotype, nonhuman primate.