

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

# APPROCHE CHIRURGICALE DE LA THERAPIE GENIQUE *IN VIVO* DES MALADIES HEREDITAIRES DU FOIE

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Biologie Médecine Santé (5)

Spécialité : Biomolécule, pharmacologie, thérapeutique (530)

Présentée

*et soutenue publiquement par*

**PODEVIN Guillaume**

Le 24 mars 2006, devant le jury ci-dessous

***Président*** Mr Yves HELOURY, professeur des universités, CHU de Nantes

***Rapporteurs*** Mme Sabine SARNACKI, professeur des universités, Hôpital Necker, Paris  
Mme Hélène GILGENKRANTZ, directeur de recherche, Institut Cochin, Paris

***Examineurs*** Mr Ignacio ANEGON, directeur de recherche, INSERM U 437, Nantes

***Directeur de thèse ;*** Mr Nicolas FERRY, directeur de recherche, INSERM CIC 04 , Nantes

## TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	3
1 Propriétés du foie.....	3
a Anatomie.....	3
b Histologie.....	3
c Régénération hépatique.....	4
d Immunité et foie.....	5
2 Maladies hépatiques et thérapie génique.....	7
a Maladies génétiques à conséquences hépatiques.....	8
b Maladies génétiques sans conséquences hépatiques.....	12
c Maladies hépatiques, thérapie génique et santé publique.....	19
III Méthodes de transfert de gènes dans le foie.....	20
a Méthodes.....	20
b Vecteurs.....	21
IV Immunité et thérapie génique.....	25
a Réaction immunitaire contre les protéines virales.....	25
b Réaction immunitaire contre le produit du transgène.....	26
TRAVAIL.....	28
1 Objectifs de l'étude.....	28
2 Transfert de gène sur foie isolé-perfusé et immunité.....	30
a Comparaison entre injection périphérique et foie isolé-perfusé.....	30
b. Etude de la réaction immunitaire et foie isolé-perfusé.....	36
c. Cette étude montrait donc que la technique de perfusion du vecteur sur un foie isolé de la circulation systémique permettait d'éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire contre le produit du transgène pour la plupart des animaux, en utilisant une protéine immunogène et une charge virale dix fois plus importante que dans l'injection périphérique. Néanmoins, les animaux le plus « tolérants » étaient ceux pour lequel l'expression du transgène était inférieure à des taux potentiellement thérapeutiques, et certains des animaux qui exprimaient ces taux thérapeutiques déclenchaient une réaction immunitaire malgré la technique du foie isolé-perfusé.	
III. Approches chirurgicales de transfert de gène dans le foie chez les gros animaux.....	45
a Transfert de gène par des rétrovirus recombinants dans le foie d'agneau.....	45
b. Etude préliminaire pour le transfert de gène dans le foie de macaques.....	52
CONCLUSION PERSPECTIVES.....	61
ANNEXES.....	64
REFERENCES.....	70

## ABREVIATIONS

AAV : Adeno-Associated Virus

ADN : Acide desoxyribonucléique

APC : Antigen presenting cell

ATP : Adenoside Tri-Phosphate

FAH : fumaryl acétoacétate hydrolase

HIV : Human Immunodeficiency virus

LDL : Low Density Lipo-protein

MOI : « Multiplicity of infection » : nombre de particules infectieuses par cellules à infecter.

OTC: Ornithine Transcarbamylase

PFIC: Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis

PCR: Polymerase Chain Reaction

UGT1 : uridine diphosphonate glucuronosyl transférase I

X-Gal : 5-bromo-4-cholo-3-indolyl beta-D-galactoside

## INTRODUCTION

### 1 PROPRIÉTÉS DU FOIE

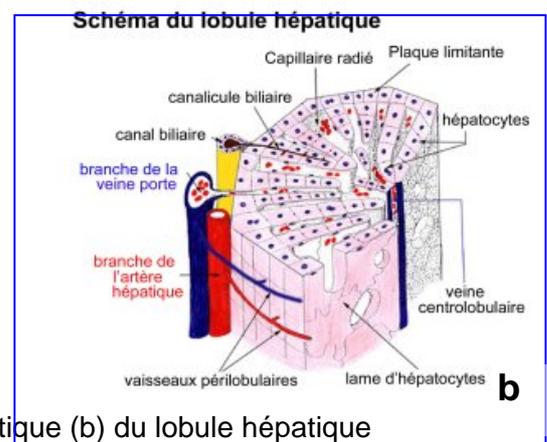
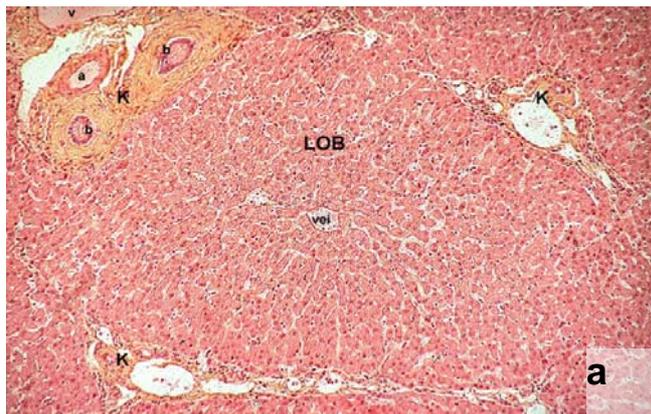
#### *a Anatomie*

Le foie est l'organe le plus volumineux et le plus vascularisé de l'organisme humain. Il pèse environ 2 kg dont 800 grammes de sang chez l'adulte. C'est le seul organe à avoir deux systèmes de circulations sanguines, un système systémique avec l'artère hépatique, apportant le sang oxygéné en provenance du cœur gauche, et un système porte avec la veine porte apportant les nutriments provenant de l'intestin via le système veineux mésentérique et correspondant à 70% du débit sanguin hépatique. Un troisième système canaliculaire permet l'excrétion de la bile vers l'intestin, la bile contenant les sels biliaires et la bilirubine conjuguée. L'ensemble de ce réseau sanguin et biliaire suit une arborescence à l'origine des segments hépatiques, permettant ainsi d'effectuer des résections respectant cette segmentation et pouvant emporter sans conséquence clinique jusqu'à 70% de la masse hépatique, c'est à dire en laissant une masse hépatique fonctionnelle correspondant à 1 % de la masse corporelle.

#### *b Histologie*

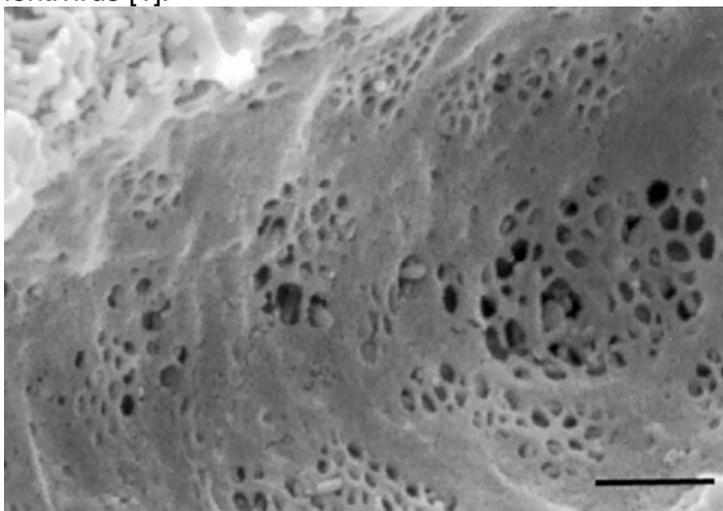
Le parenchyme hépatique est constitué d'unités microscopiques, les lobules hépatiques séparés par des espaces conjonctifs. Le lobule hépatique, de forme hexagonale en coupe, mesure 0,7 mm dans

sa plus grande largeur et 2 mm de longueur. Dans l'espèce humaine, les lobules sont accolés les uns aux autres. Les structures conjonctives sont limitées à des zones situées aux angles de l'hexagone et sont appelées espaces de Kiernan ou espaces portes (figure 1a page suivante). Le lobule hépatique comporte trois types d'éléments : les travées de Remak, les capillaires radiés (ou capillaires sinusoides) et les canalicules biliaires. Les travées de Remak sont des travées cellulaires d'hépatocytes qui rayonnent à partir du centre du lobule occupé par la veine centrolobulaire. La réunion des veines centrolobulaires est à l'origine des veines sus-hépatiques. Les capillaires radiés ou capillaires sinusoides suivent la même orientation que les travées de Remak. Les canalicules biliaires, non décelables en technique de coloration courante, ont une orientation perpendiculaire. L'espace porte est formé de tissu conjonctif fibreux à l'intérieur duquel se trouvent les branches de la veine porte et de l'artère hépatique, un canal biliaire interlobulaire, et des vaisseaux lymphatiques. Cette architecture est représentée sur la figure 1b ci-dessous.



**Figure 1** : vue histologique (a) et représentation schématique (b) du lobule hépatique

Les parois du sinusoides sont constituées chez l'homme d'un endothélium fenestré. Ces fenestrations ont un diamètre de l'ordre de 100 à 200 nm et facilitent les échanges entre les hépatocytes et le sang (figure 2 ci-dessous). Cette caractéristique est fondamentale pour les techniques de thérapie génique hépatique in vivo, puisque les vecteurs viraux utilisés dans ces traitements ont un diamètre inférieur à la taille de ces fenestrations, allant de 26 nm pour les virus adeno-associés (AAV) à 133 nm pour les lentivirus [1].



**Figure 2** : vue au microscope électronique à balayage de l'endothélium fenestré des sinusoides humains.

### *c Régénération hépatique*

Environ 70% de la masse cellulaire hépatique est composée d'hépatocytes matures, qui peuvent être séparés des autres cellules par sédimentation différentielle. Ces autres cellules non parenchymateuses sont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales biliaires, les cellules étoilées dites de Ito, les cellules de Küpffer, et les cellules souches ou cellules ovales. Les

hépatocytes ont un renouvellement très lent, avec moins de 0,1% d'hépatocytes en division dans les conditions normales, mais ils ont conservé l'extraordinaire capacité de se diviser après une agression de nature variable permettant la régénération du foie jusqu'à obtenir son volume d'origine. Après une hépatectomie de 70% chez le rat, tous les hépatocytes matures entrent dans le cycle cellulaire de division en 24 heures, suivis par les autres types cellulaires [2] (figure 3 ci-dessous). La vague de prolifération migre des espaces portes vers la région centro-lobulaire dans les lobules hépatiques. Contrairement à la moelle osseuse, cette répllication cellulaire provient essentiellement des cellules matures et non pas de cellules souches. En effet, plus de 95% des hépatocytes se divisent en réponse à une hépatectomie de 70% [2]. Les cellules souches hépatiques existent, mais elles ne sont mobilisées (le plus souvent sous la forme de cellules dites ovaies) et elles ne se différencient en hépatocytes que lorsque la prolifération hépatocytaire est bloquée ou dans les situations de destruction hépatocytaire chronique [3].

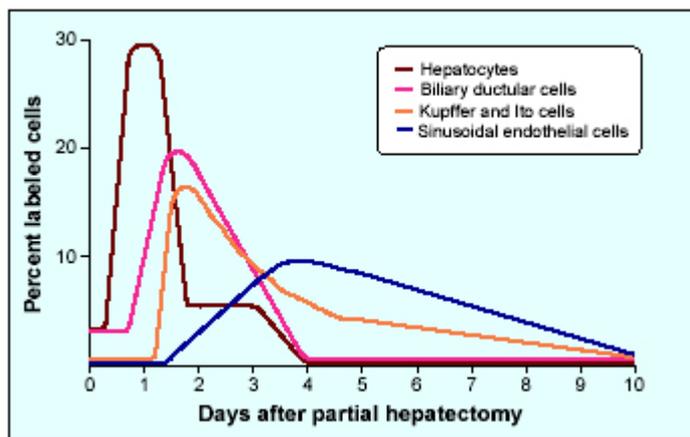


Figure 3 : cinétique de synthèse d'ADN des différentes lignées cellulaires après hépatectomie partielle (d'après Michalopoulos [2])

#### d Immunité et foie

Le long des parois du sinusoiide hépatique se trouvent les cellules de kuppfer, ou cellules dendritiques, qui sont les macrophages du foie et ont un rôle primordial dans le système de défense de l'organisme. La situation anatomique particulière du foie lui donne en effet un rôle prépondérant dans le système immunitaire. Il draine par la veine porte et les lymphatiques portaux l'ensemble des antigènes provenant du système digestif, qui est la principale porte d'entrée de l'organisme en provenance de l'extérieur. L'artère hépatique apporte d'autre part les substances endogènes de la circulation systémique. Ce système macrophagique permet la neutralisation de particules minérales, de bactéries, virus, toxines, et de certains allergènes alimentaires.

Les macrophages hépatiques présentent les peptides provenant de l'antigène et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) au lymphocyte T en y associant un signal de danger par des cytokines, débutant ainsi la réaction immunitaire spécifique cytotoxique et humorale dirigée contre l'antigène (figure 4 page suivante). Cette étape initiale est primordiale, puisqu'elle est responsable du caractère tolérogène ou non du foie vis à vis d'un antigène étranger, et donc du vecteur ou de son contenu lors d'un transfert de gène *in vivo*. La compréhension de ces mécanismes initiaux impliquant les cellules présentatrices d'antigène (APC) hépatiques a permis d'entreprendre des traitements augmentant la tolérance hépatique. Par exemple, la présence ou non du signal spécifique de danger est dépendant du caractère mature ou non des APC. Des expériences rendant les APC immatures par incubation en présence de cytokines inhibitrices (IL 10, TGF  $\beta$ ) ont permis d'augmenter la tolérance du foie [4]. La costimulation des APC et des lymphocytes T passe d'autre part par le CD28 et le CD 40. Une tolérance a aussi été induite par l'utilisation d'inhibiteur du CD 28 comme le CTLA4-Ig [5] ou par des anticorps anti CD40 ligand [6]. Ces expériences confirment que les APC hépatiques ou cellules de

Küpfers sont la clef de voûte du système immunitaire au niveau du foie, et que celui-ci devient tolérant si l'étape d'activation de ces APC ne se produit pas.

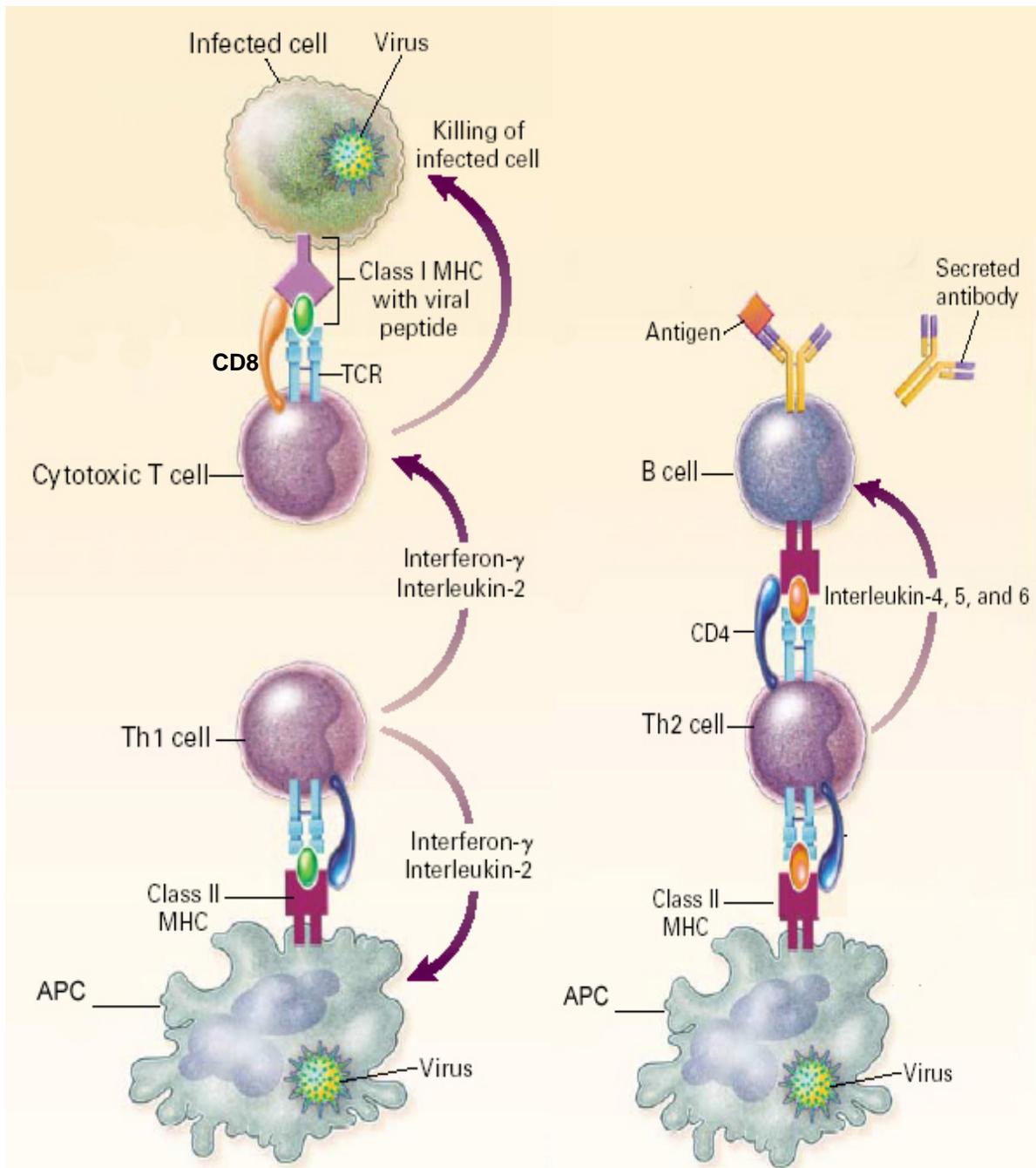


Figure 4 : Voies de déclenchement de la réaction immunitaire spécifique cytotoxique

(lymphocyte T) et humorale (lymphocyte B) par les APC, ici infectées par un virus.

(d'après Delves [7])

MHC : complexe majeur d'histocompatibilité, TCR : récepteur des lymphocytes T, APC : cellule présentatrice d'antigène.

Le foie a donc plusieurs qualités intéressantes pour la thérapie génique. C'est un organe-clef par les fonctions vitales qu'il assure, notamment la synthèse de protéines sériques, le métabolisme des lipides et des glucides, et la détoxification. Certaines mutations qui abolissent une fonction hépatique sont souvent responsables de maladies létales sans traitement actuel excepté la transplantation hépatique. Toutes ces fonctions étant réunies dans un seul organe, une technique de transfert de gène qui s'avère efficace pour la correction d'un déficit particulier est a priori transférable pour les autres déficits. Une technique ciblée sur cet organe unique richement vascularisé est d'autre part plus facile à mettre en œuvre qu'un traitement pour des déficits diffus comme les myopathies.

De plus, la présence d'un endothélium fenestré dans le foie humain permet une pénétration facile des vecteurs viraux de transfert de gène avec un accès direct aux hépatocytes. La réaction immunitaire éventuellement déclenchée par ces vecteurs viraux peut être évitée en inhibant l'activation des APC hépatiques ou cellules de Küpffer. Enfin, son extraordinaire capacité de régénération peut être mise à profit pour remplacer les hépatocytes déficitaires par ceux qui sont corrigés en bénéficiant d'un avantage sélectif.

## 2 MALADIES HÉPATIQUES ET THÉRAPIE GÉNIQUE

Le foie est le siège de nombreuses voies métaboliques dont certaines peuvent être l'objet d'un déficit génétique à l'origine de maladies potentiellement graves. Parmi l'ensemble de ces hépatopathies héréditaires, plusieurs critères expérimentaux ou cliniques permettent la sélection d'un groupe de maladies candidates, théoriquement accessibles à la thérapie génique.

Sur le plan expérimental, l'état actuel des techniques de thérapie génique implique en premier lieu que ces maladies candidates correspondent à un déficit génétique simple sur le modèle « un gène – une protéine », sans régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle élaborée. L'expérimentation pré-clinique nécessite de plus la disponibilité d'un modèle animal pour chaque maladie étudiée. La présence d'un avantage sélectif en faveur des hépatocytes corrigés génétiquement est d'autre part un facteur extrêmement favorable, puisque l'on peut envisager un remplacement complet des hépatocytes malades.

Sur le plan clinique, il faut comme dans toute nouvelle thérapeutique évaluer le rapport bénéfice-risque du traitement par transfert de gène, et dans une première approche, seules les maladies graves feront l'objet de recherche expérimentale. D'autre part, la disponibilité pour certaines maladies d'un traitement alternatif à la thérapie génique, efficace et non toxique à moyen ou long terme, enlève beaucoup d'intérêt clinique à des recherches répondant pourtant à tous les critères expérimentaux précités. Enfin, la présence d'une atteinte multi-organe complique les modalités d'un traitement totalement efficace pour le patient et exclue dans un premier temps ces maladies du groupe des candidates. Le tableau 1 ci-dessous liste les maladies métaboliques héréditaires potentiellement candidates à la thérapie génique. Ces hépatopathies peuvent être classées en deux groupes, celles qui sont associées à des lésions histologiques du foie ou celles qui ont des manifestations uniquement extra-hépatiques. Plusieurs exemples de ces maladies candidates vont nous permettre d'illustrer la pertinence de ces différents critères et d'expliquer l'intérêt que nous avons porté à la maladie de Crigler Najjar.

Tableau 1 : maladies métaboliques potentiellement candidates à la thérapie génique (d'après [1, 8-11]).

Maladies génétiques à conséquences hépatiques
<i>Déficit en alpha-1-antitrypsine</i>
<i>Cholestase intrahépatique familiale progressive type 1, 2 et 3</i>
<i>Désordre de synthèse des acides biliaires</i>

*Fructosémie congénitale*  
*Glycogénoses de type I, II, IV*  
*Hémochromatose*  
*Mucopolysaccharidose type 7*  
*Tyrosinémie de type I*  
*Maladie de Wilson*

#### Maladies génétiques sans conséquences hépatiques

*Afibrogénémie*  
*Analbuminémie*  
*Crigler Najjar*  
*Galactosémie*  
*Hémophilie A et B*  
*Hypercholestérolémie familiale de type IIa*  
*Hyperlipoprotéinémie*  
*Déficit en ornithine transcarbamylase*  
*Phénylcétonurie*  
*Porphyrrie aigüe intermittente*

#### *a Maladies génétiques à conséquences hépatiques*

Le premier groupe d'hépatopathies héréditaires candidates avec conséquences histologiques hépatiques inclut la tyrosinémie de type I, la cholestase intrahépatique familiale progressive de type III, le déficit en alpha-1-antitrypsine et la maladie de Wilson. Le point commun de ces maladies est l'accumulation de substrats toxiques pour l'hépatocyte entraînant une destruction progressive du foie. Dans de telles situations, les hépatocytes sains ou corrigés peuvent avoir un avantage prolifératif par rapport aux hépatocytes atteints [12-14]. Un transfert de gène ne corrigeant qu'une partie même modeste des hépatocytes peut donc permettre une guérison progressive de tout le foie grâce à cet avantage sélectif.

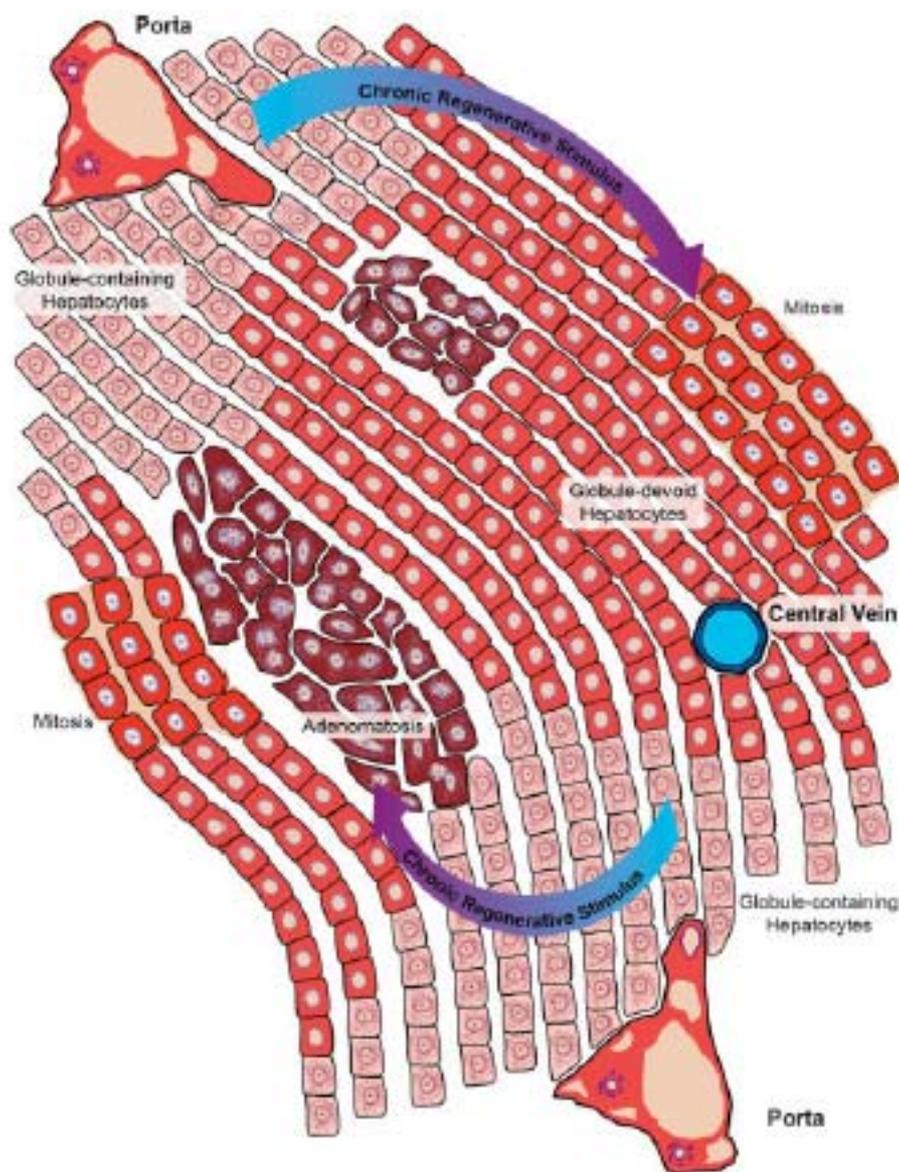
*La tyrosinémie de type I* est une maladie autosomale récessive caractérisée par une atteinte hépatique et rénale, secondaire à l'accumulation de tyrosine et de ses dérivés. Il s'agit du déficit de la fumaryl acétoacétate hydrolase (FAH) impliquée dans le catabolisme de la tyrosine. Les enfants ont rapidement une insuffisance hépatique qui peut s'associer à une tubulopathie avec un rachitisme hypophosphatémique et des signes neurologiques, pouvant provoquer des décès précoces. La survenue chez les survivants d'hépatocarcinomes dans les premières années de vie mène au décès avant 10 ans [15]. Un traitement médical par le NTBC (2 nitro-4trifluorométhylbenzoyl-1-3-cylohexanédione) ou nitisinone (Orfadin®), molécule inhibant le catabolisme de la tyrosine en amont de la FAH au niveau de la para-hydroxy-phenyl-pyruvate oxydase, a été instauré à partir de 1992, avec des résultats cliniques spectaculaires [16]. Associé à un régime pauvre en tyrosine et en phénylalanine, il évite la production de dérivés toxiques, notamment la succinylacétone et le fumarylacétoacétate, et donc probablement l'évolution vers l'insuffisance hépatocellulaire. La possibilité d'une transformation maligne malgré le traitement était débattue jusqu'à récemment [17, 18] mais elle s'est confirmée chez un garçon de huit ans qui a développé un hépatocarcinome après plus de 5 ans d'un traitement médical bien conduit [19].

Des modèles de souris sont disponibles [20]. Ils ont permis de développer différentes stratégies de transfert de gène, en bénéficiant d'une repopulation hépatique par avantage prolifératif spontané [12, 21]. Mais l'efficacité du traitement médical a fait que jusqu'à aujourd'hui, aucun essai clinique de thérapie génique n'a été envisagé.█

*La cholestase intrahépatique familiale progressive* (PFIC : Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis) de type III fait partie des déficits de transport canaliculaire des acides biliaires, dans lesquels est aussi incluse la maladie de Byler (PFIC type I). Elle est due à l'atteinte du gène ABCB4 codant la synthèse de la glycoprotéine MDR3 impliquée dans l'excrétion canaliculaire des phospholipides [22]. L'absence d'excrétion de ces phospholipides dans la maladie provoque une absence de micellisation des sels biliaires, qui gardent donc leur capacité détergente entraînant une destruction de la membrane des canalicules biliaires et progressivement du foie. Les formes sévères de la maladie peuvent mener à la transplantation hépatique dans la première décennie [23]. Un modèle de souris a été développé (déficit en *mdr2*) et a permis de comprendre la physiopathologie de cette maladie rare [24]. Des essais récents de transplantation d'hépatocytes syngéniques et transgéniques ont permis une guérison de souris déficitaires, avec une repopulation spontanée de l'ordre de 10% par avantage sélectif [14]. Il n'y a pas eu d'essai de thérapie génique dans ce modèle, en sachant que théoriquement, il faudrait agir précocement pour éviter la transformation maligne des cellules endommagées par la maladie initiale [25].

*Le déficit en alpha-1-antitrypsine* est une maladie génétique initialement décrite comme un emphysème pulmonaire précoce de l'adulte. L'alpha-1-antitrypsine est une glycoprotéine sanguine sécrétée principalement par les hépatocytes et jouant un rôle majeur d'inhibition des protéases, en particulier de l'élastase neutrophile dont l'activité non régulée est responsable de l'emphysème pulmonaire [26, 27]. L'alpha-1 antitrypsine est codée par un gène polymorphe localisé sur le chromosome 14, dont les allèles ont été classés en normal (M), déficient (Z, S) et null. Le risque de développer une maladie concerne les sujets de phénotype null-null, Z-null ou ZZ, il est variable entre sujets de même phénotype. L'atteinte hépatique se manifeste essentiellement chez les homozygotes ZZ par une cholestase et évolue vers la cirrhose dans 3% des cas, 15% des grands enfants ayant un bilan hépatique perturbé [28, 29]. Les mécanismes d'altération du foie sont liés à l'accumulation de polymères de l'alpha-1-antitrypsine mutée dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes [30]. Des recherches récentes ont permis d'expliquer la prédisposition à l'hépatocarcinome (figure 5 page suivante), qui serait secondaire à un signal de régénération chronique provenant des hépatocytes ayant des inclusions d'alpha-1-antitrypsine mutée [31].

Des modèles de souris transgénique pour l'alpha-1-antitrypsine humaine ont permis la mise au point de protocole de thérapie cellulaire du foie [32], en étudiant en particulier la réponse immunitaire à la transplantation d'hépatocytes modifiés génétiquement [33]. Quelques études ont montré la possibilité de transfert du gène de l'alpha-1-antitrypsine dans le foie, par des méthodes *ex vivo* [34] et *in vivo* [35-37]. Mais sur le plan de la pertinence clinique, il s'agit essentiellement d'une maladie pulmonaire et le but des essais de thérapie génique a été jusqu'ici de corriger cette atteinte, quel que soit l'organe sécrétant [38, 39]. Il semble en effet qu'un traitement de thérapie génique dirigé vers les poumons soit suffisamment efficace sur le plan clinique, sans que des taux normaux de production d'alpha-1-antitrypsine soient atteints [40]. Ainsi, deux essais cliniques de phase I ont été réalisés ou sont en cours. Dans une première étude, 5 patients ont reçu des liposomes cationiques contenant le gène de l'alpha-1-antitrypsine dans l'épithélium respiratoire d'une narine [41]. Cette étude a montré que la sécrétion locale d'alpha-1-antitrypsine grâce au transfert de gène permettait une diminution de l'inflammation locale, comparée à l'autre narine qui servait de contrôle. Dans la seconde étude en cours, 12 patients vont recevoir des AAV recombinants par voie intramusculaire [42]. La méthodologie de ces essais cliniques confirme que l'objectif actuel n'est pas la correction du déficit hépatique.



**Figure 5** : modèle hypothétique de la carcinogénèse dans le déficit en alpha-1-antitrypsine (d'après Rudnick [31]).

Les hépatocytes contenant des globules (rose pâle) tendent à être périportaux. Etant « malade mais pas mort », ils envoient un signal de régénération chronique qui est reçu par les hépatocytes sans globule (rose sombre) qui tend à provoquer dans la région centro-lobulaire des mitoses (rouge) et des foyers d'adénomatose (rouge sombre).

*La maladie de Wilson* décrite en 1912 est une maladie génétique récessive entraînant une surcharge hépatocytaire en cuivre par défaut d'excrétion biliaire. Plusieurs mutations ont été identifiées sur le gène de l'ATPase 7B, cette protéine agissant à différentes étapes du métabolisme intracellulaire du cuivre. Les manifestations hépatiques sont précoces et mènent à la cirrhose dans la moitié des cas. Chez plus d'un quart des patients, les manifestations cliniques peuvent aussi concerner le système nerveux central, le système endocrinien, le rein [43]. Le traitement médical consiste à restaurer l'homéostasie du cuivre hépatique en chélatant l'excès de cuivre (D-pénicillamine, trientine, BAL, tetrathiomolybdate) permettant une excrétion urinaire, et en utilisant le Zinc qui induit une augmentation de synthèse de metallothionéine séquestrant le cuivre dans les entérocytes sous forme non toxique. Certains patients développent des hépatites aiguës voire fulminantes imposant la

transplantation hépatique [44]. Le risque d'hépatocarcinome est faible, mais semble augmenté avec le traitement chélateur [45-47].

Les rats Long-Evans cinnamon présentent un déficit génétique responsable de la maladie, mais sans évolution vers la cirrhose. Ce modèle animal a été utilisé pour préciser le rôle du gène de l'ATPase 7B dans les voies métaboliques intracellulaires du cuivre en utilisant des adénovirus recombinants [48] ou montrer la correction du déficit par des approches de transplantation d'hépatocytes syngéniques [13, 49]. Mais l'existence d'un traitement médical efficace pouvant être instauré précocement chez les cas index rend l'alternative thérapeutique par thérapie génique questionnable.

**Tableau 2** : Maladies avec atteinte hépatique

Maladie	transmission	MIM	locus	Protéine mutée	nb de cas	Traitement	Evolution	modèle animal	Recherche préclinique*
Tyrosinémie de type 1	autosomale récessive	276700	15q23-q25	FAH	1/10000	diététique et nitrosinone	risque HCC	souris albinos hrdr1 -	ex vivo[12] in vivo [21]
PFIC de type III	autosomale récessive	602347	7q21.1	MDR3	?	acide ursodésoxy-cholique	risque HCC	souris mdr2 -	non
Déficit en AAT	autosomale récessive	107400	14q32.1	AAT	1/2000	Perfusion d'AAT transplantation hépatique	risque HCC Emphys	souris transgéniques AATh	ex vivo [34] in vivo [35, 37]
Wilson	autosomale récessive	277900	13q14-q21	ATPase 7B	1/30000	Chélateurs du Cu.	risque HCC	rats Long-Evans cinnamon	non

\* : de transfert de gènes ; PFIC: Cholestase intrahépatique familiale progressive; AAT: alpha-1-antitrypsine; HCC: hénatocarcinome; Emphys: emphysème pulmonaire

### *b Maladies génétiques sans conséquences hépatiques*

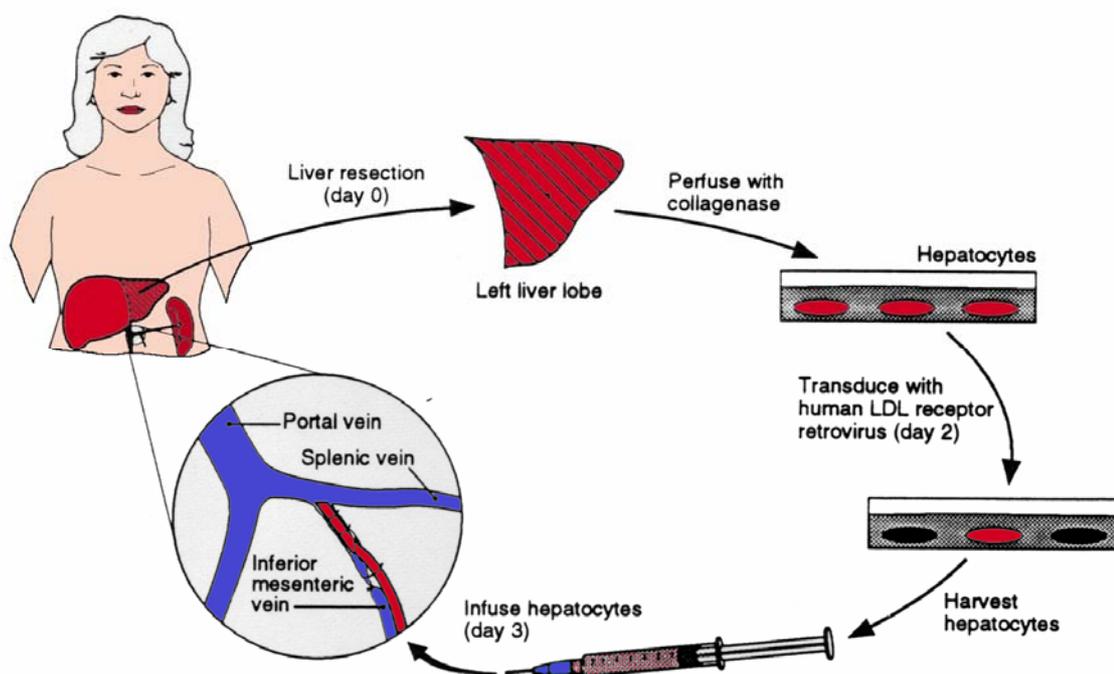
Parmi les déficits génétiques sans anomalies histologiques du foie accessibles à la thérapie génique, nous citerons des déficits métaboliques comme le déficit en ornithine transcarbamylase, l'hypercholestérolémie familiale de type IIa, les déficits de la coagulation comme l'hémophilie B, et la maladie de Crigler Najjar. Dans ce groupe, il n'y a pas d'avantage sélectif mais la guérison peut être obtenue en ne corrigeant qu'une partie des hépatocytes, cette proportion d'hépatocytes fonctionnels étant variable en fonction des maladies mais de l'ordre de 10 à 20 %.

*Le déficit en ornithine transcarbamylase (OTC)* est une maladie à transmission liée à l'X, due à une mutation du gène codant l'OTC, enzyme mitochondriale hépatique impliquée dans le cycle de l'urée. Cette pathologie se manifeste souvent dès la naissance par des signes neurologiques, l'accumulation d'ammoniaque secondaire au déficit enzymatique entraînant une neurotoxicité affectant le système nerveux central. Chez la fille, la gravité de la maladie est très variable en fonction du degré d'inactivation de l'X muté, mais peut-être mortelle [50]. Il est important chez le garçon de faire le diagnostic anténatal de cette maladie et d'en débiter le traitement symptomatique et de détoxication dès la naissance pour le poursuivre jusqu'à une éventuelle transplantation hépatique, afin d'éviter l'évolution létale (de 75 à 95% des garçons) ou les séquelles avec retard mental [15, 50]. Les souris SPF/ash, déficientes pour le gène de l'OTC, ont permis différents essais de thérapie génique et cellulaire. Nous avons développé avec d'autres équipes des modèles de thérapie génique *in vivo* avec des vecteurs rétroviraux [51](annexe 1) ou adénoviraux [52-54]. Des expériences de transplantation d'hépatocytes provenant de greffons partagés allogéniques ont récemment enrôlé

deux garçons nouveaux-nés dans des essais cliniques, avec une efficacité transitoire permettant l'attente d'une transplantation hépatique à 6 et 7 mois de vie [55, 56]. Un essai clinique de thérapie génique *in vivo* utilisant des adénovirus recombinant a inclus 18 adultes avec un déficit en OTC partiel, dont 14 femmes hétérozygotes symptomatiques et 4 hommes hémizygotés métaboliquement stables. Il n'a pas permis la correction du déficit et s'est compliqué dans tous les cas d'une réaction inflammatoire plus ou moins importante secondaire à la réaction immunitaire cytotoxique et humorale développée contre le vecteur adénoviral [57]. Ces complications ont mené dans un cas au décès du patient lors d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) 36 heures après l'injection du vecteur adénoviral [58]. Cette maladie, compte tenu de l'atteinte précoce néonatale des garçons hémizygotés, serait un bon modèle de thérapie génique *in utero* [59]. Elle pose après la naissance le problème de la co-morbidité induite par toutes les approches invasives, toute acidose métabolique pouvant être fatale [51] (annexe 1).

*L'hypercholestérolémie familiale de type IIa* est une maladie autosomale dominante par défaut d'un gène codant le récepteur des LDL. Comme il a été répertorié plus de 840 mutations impliquées dans le défaut de fonctionnement des récepteurs LDL, des patients peuvent être des équivalents d'homozygotes avec une mutation différente sur chaque allèle. Ce défaut fonctionnel des récepteurs induit une synthèse hépatique accrue de cholestérol et une augmentation de la durée de vie plasmatique de celui-ci. Cette hypercholestérolémie, qui peut dépasser 8 g/L chez l'homozygote, est responsable de dépôts cholestéroliques dans de nombreux tissus et en particulier de dépôts vasculaires avec un risque d'atteinte coronaire dès l'enfance dans les cas les plus graves. Le traitement médical associe chez l'hétérozygote un régime hypocholestérolémiant et des médicaments inducteurs du récepteur normal aux LDL. Chez l'homozygote, seules des aphéreses LDL bi-mensuelles permettent de stabiliser les lésions vasculaires, mais il s'agit d'un traitement extrêmement contraignant [60]. Plusieurs patients ont bénéficié d'une transplantation hépatique [61] ou d'une transplantation combinée cœur-foie [62], mais cette option thérapeutique additionne les problèmes d'immunosuppression et de manque de greffon déjà connus à la morbidité chirurgicale sur ce terrain vasculaire particulier [63].

Le modèle animal le plus utilisé est le lapin Watanabe qui a permis des essais de transplantation d'hépatocytes allogéniques [64], et de thérapie génique avec des vecteurs rétroviraux [65, 66], adénoviraux [67] ou lentiviraux [68]. Un essai clinique de transplantations d'hépatocytes modifiés génétiquement *ex vivo* ont enrôlé 5 patients [69, 70]. Une hépatectomie partielle permettait de récolter des hépatocytes autologues qui étaient mis en culture, infectés *in vivo* par des rétrovirus recombinants portant le gène des récepteurs LDL, puis réinjectés par voie portale au patient. Trois patients ont montré une réduction significative, durable mais partielle du taux de LDL (Figure 6 ci-dessous). Il n'y a pas eu d'autres essais cliniques, car les méthodes actuelles de thérapie génique ne permettent pas de modifier une proportion d'hépatocytes suffisante pour atteindre une efficacité clinique correspondant à l'investissement des patients et de l'équipe médicale.



**Figure 6** : procédure de transplantation d'hépatocytes avec transfert de gène *ex vivo* chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (d'après Grossman [69]). Les déficits génétiques de la coagulation sanguine peuvent survenir à différents niveaux des 2 voies, intrinsèque et extrinsèque, qui convergent avec la conversion protéolytique de la prothrombine en thrombine, elle-même responsable de la conversion du fibrinogène en fibrine. Il peut s'agir de l'absence de facteurs clés (hémophilie), de la production de protéines anormales (facteur V de Leyden) ou de désordre dans la sécrétion de protéines (déficience combinée des facteurs V et VIII). Le foie est directement impliqué dans les sécrétions des facteurs anti-hémophiliques et du fibrinogène.

*L'hémophilie* est une maladie connue depuis l'antiquité. Concernant l'hémophilie B, il s'agit d'une maladie récessive liée à l'X due au déficit du facteur IX. Plus de 1000 mutations ont été répertoriées sur le gène porté par le bras long du chromosome X. Le diagnostic anténatal est donc uniquement possible si la mutation familiale est connue. Le déficit en facteur IX provoque des saignements extériorisés, des hématomes, des hémarthroses, et il peut engager le pronostic vital lors d'hémorragie interne notamment intracrânienne après un traumatisme. La maladie est dite sévère lorsque le facteur IX est inférieur à 1%, modérée entre 1 et 5%, mineure entre 6 et 25%. Le traitement substitutif repose sur la perfusion de facteur IX lors de saignements ou de situations à risque (chirurgie, traumatismes). Cette substitution comporte les risques infectieux transfusionnels maintenant bien contrôlés et des risques immunologiques avec apparition d'un anticoagulant circulant dans 6% des cas, rendant ce traitement moins efficace. Ces complications et surtout les séquelles fonctionnelles articulaires justifient la recherche de traitement substitutif.

Des modèles animaux de chien et de souris ont permis le développement de nombreux protocoles de thérapie génique *in utero* [71-74] et après la naissance [75-87]. L'hémophilie fait partie des indications où les essais cliniques ont débuté depuis plusieurs années [88-93]. Une première étude menée par l'équipe de Katherine High et Mark Kay a inclus 11 patients. Ceux-ci ont reçu une ou plusieurs injections intramusculaires contenant des AAV de sérotype 2. La tolérance a été satisfaisante, mais l'expression du transgène n'a pas permis de correction significative du déficit du facteur IX malgré des doses importantes de vecteur pour les derniers sujets. Une autre série de patients a reçu récemment le même type de vecteur mais administré via l'artère hépatique. Certains patients ont eu des taux thérapeutiques de facteur IX, mais de façon transitoire du fait d'une réaction immunitaire dirigée contre les protéines de la capsid virale et détruisant les hépatocytes infectés [92, 93]. Une autre équipe a utilisé des vecteurs rétroviraux dans un essai clinique de phase I chez 13 patients ayant une hémophilie A [90]. L'injection se faisait par voie veineuse périphérique. Cet essai a montré une bonne tolérance du vecteur pour les patients et une expression à long terme du transgène chez certains patients même si elle était là encore inférieure aux doses thérapeutiques. L'hémophilie est

donc la maladie où l'expérimentation en thérapie génique est la plus avancée, et l'hépatologie ne peut que bénéficier de ces expériences en hématologie.

**Tableau 3** : Etudes cliniques de transfert de gène pour la correction des hémophilies. *La maladie de Crigler Najjar*, décrite par ces deux auteurs en 1952, est une maladie autosomale récessive

Référence	Nb patients phase étude	Facteur	Vecteur	Méthode	Dose pg / kg	Résultats
Kay 2000 [88]	3 / I	IX <1%	AAV 2	<i>In Vivo</i> 1 IM	$2 \cdot 10^{11}$	Pas de toxicité. Expression modeste.
Manno 2003 [89]	8 / II	IX <1%	AAV 2	<i>In Vivo</i> IM multiple	de $2 \cdot 10^{11}$ à $1,8 \cdot 10^{12}$	Pas de toxicité. Expression 1 à 2%.
Powel 2003 [90]	13 / I	VIII <1%	RétroV	<i>In Vivo</i> 3 iV périP	de $2,8 \cdot 10^7$ à $8,8 \cdot 10^8$	Pic de sécrétion de 2,8 à 19%. Pas de modification du phénotype durable.
Manno 2006 [93]	7 / I-II	IX <1%	AAV 2	<i>In Vivo</i> Art hépatique	de $8 \cdot 10^{10}$ à $2 \cdot 10^{12}$	Taux thérapeutiques transitoires. Réaction immunitaire contre la capsid virale.

pg/kg : particules génomiques / kg ; IM : injections intra-musculaires ; RétroV : rétrovirus (Moloney) ; iV : injections intra-veineuses

secondaire au déficit de la bilirubine uridine diphosphonate glucuronosyl transférase de sous-groupe I (UGT1), responsable d'un défaut de conjugaison de la bilirubine. Seul le type I de la maladie de Crigler Najjar est sévère, car le type II et la maladie de Gibert, le déficit en UGT1 répond au traitement inducteur par le phénobarbital, ce qui permet d'obtenir une diminution de la bilirubine libre [94]. La synthèse de l'UGT1 dépend d'un complexe de gènes localisé sur le chromosome 2, dont plus de 50 mutations ou délétions ont été décrites, responsable de l'hétérogénéité génétique de la maladie [95]. La conséquence du défaut de conjugaison dans le type I est un ictère majeur apparaissant dès les premiers jours de vie, avec un risque d'encéphalopathie par passage de la bilirubine libre liposoluble à travers la barrière hémato-encéphalique, ce qui entraîne la destruction des noyaux gris centraux et des centres de l'audition [96]. Les enfants doivent donc rester sous photothérapie 10 à 12 heures par 24 heures (Figure 7 ci-dessous), en attente d'une transplantation hépatique, seul traitement curatif actuel.



Figure 7 : photothérapie nocturne de Mélissa et Marine, deux patientes françaises atteintes de la maladie de Crigler Najjar

(Image provenant du site de l'association française de Crigler Najjar ; <http://crigler-najjar.9online.fr>). Le rat Gunn est le modèle animal très utilisé de cette maladie. Il a permis plusieurs expériences de thérapie cellulaire avec des hépatocytes couplés à des billes de collagènes, encapsulés ou des hépatocytes fœtaux [97-100], ainsi que de nombreuses expériences de thérapie génique [101] en testant la plupart des vecteurs disponibles : adénovirus [102-104], rétrovirus [105, 106], vecteurs inertes [107], chimère ARN/ADN [108]. Notre équipe a récemment montré une correction complète et permanente du déficit grâce à des injections intraveineuses chez des rats Gunn nouveau-nés de rétro-virus (figure 8 ci-dessous) [109] ou de lentivirus [110]. Deux essais cliniques de thérapie cellulaire ont été mis en oeuvre par transplantation d'hépatocytes [111], qui ont confirmé que cette approche n'est pas suffisante pour obtenir une guérison.

Il s'agit d'une des meilleures maladies candidates à la thérapie génique puisqu'elle remplit tous les critères précités de recherche (gène cloné, modèle animal disponible) et clinique avec un rapport bénéfice-risque important, l'absence de traitement médical curatif autre que la transplantation, et l'absence d'atteinte d'autres organes. Le fait qu'il n'y ait pas d'avantage sélectif dans cette maladie impose un taux de transfert de gène important, supérieur à 10%. Les travaux récents de notre équipe chez les rats Gunn nouveau-nés suggèrent qu'un traitement précoce par transfert de gène puisse permettre d'atteindre ces objectifs thérapeutiques en clinique humaine. Nous envisageons donc de développer un modèle de transfert de gène pré-clinique chez le rat Gunn puis le primate, avant de réaliser prochainement un essai clinique chez ces patients.

n

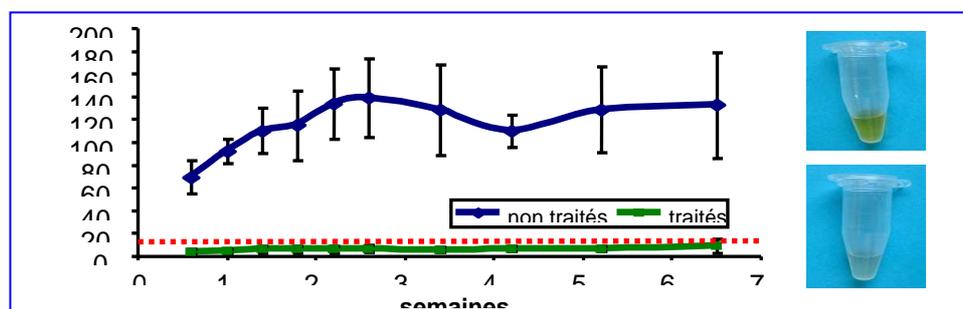


Figure 8 : Bilirubinémie chez les rats gunn, après transfert de gène par des rétrovirus recombinants injectés par voie veineuse périphérique en période néonatale.

Tableau 4 : Maladies sans atteinte hépatique

Maladie	transmission	MIM	locus	Protéine mutée	nb de cas	Traitement	Evolution	modèle animal	Recherche Préclinique*	essai clinique*
Déficit en OTC	liée à l'X	311250	Xp21.1	OTC	1/80000	diététique. transplantation hépatique.	coma hyper- amoniémique	souris SPF/ash	in vivo [51-54].	in vivo [57, 58]
Hyperchol. IIa	autosomale dominante	143890	6 loci **	récepteur LDL	1/500	diététique. aphérèses LDL.	risque cardio- vasculaire	lapin Watanabe	ex vivo [65, 66] in vivo [67, 68]	ex vivo [69, 70]
Hémophilie B	liée à l'X	306900	Xq27.1- q27.2	facteur IX	1/25000	perfusion facteur IX	saignement, arthropathie	chien hémophile, souris	in utero [71-74] in vivo [74-79, 81-84, 86]	in vivo [88- 90, 92].
Crigler Najjar	autosomale récessive	191740	2q37	UGT1	1/1000000	photothérapie. transplantation hépatique.	ictère nucléaire	rat Gunn	in vivo [102-106, 108-110]	non

\* : de transfert de gènes ; OTC : ornithine transcarbamylase ; Hyperchol.: Hypercholestérolémie familiale

\*\* : 19p13.2, 1q21-q23, 9q22-q31, 8p21-p12, 7p15, 3p21.2-p14.1

### *c Maladies hépatiques, thérapie génique et santé publique*

Si on exclut l'hypercholestérolémie familiale, l'ensemble des maladies citées précédemment est classé dans le groupe des maladies rares, puisque leur incidence varie entre 1/2000 pour le déficit en alpha-1-atitrypsine chez les Européens du Nord [28, 112] et 1/10<sup>6</sup> pour la maladie de Crigler Najjar [15]. En terme de politique de santé publique, on pourrait donc se poser la question de l'utilité de développer des programmes de recherche sur ces thématiques alors que des pathologies plus courantes et encore mortelles ne sont pas résolues. Des éléments de réponse économiques, médicaux, scientifiques et éthiques peuvent être apportés.

Le nombre potentiel de malades pouvant bénéficier des techniques de transfert de gène dans le foie est finalement non négligeable lorsqu'on cumule l'ensemble des indications précitées. Or, l'impact économique est important puisqu'il s'agit le plus souvent de pathologies lourdes, avec parfois la conséquence d'une institutionnalisation à vie comme par exemple chez les enfants ayant des séquelles neurologiques dans les déficits en OTC. Les estimations de coût sont variables en fonction des pays et sont très sensibles aux différents systèmes de santé. Une étude européenne a calculé un coût de 80000 € pour une transplantation hépatique, traitement final de nombreuses hépatopathies héréditaires, coût associé à celui du traitement immunosuppresseur à vie de 7000 € par mois [113]. Chez les patients hémophiles, sans parler du traitement substitutif lors de traumatismes, le surcoût induit pour chaque intervention chirurgicale même bénigne peut être majeur, du fait du traitement substitutif et de l'augmentation de la durée d'hospitalisation. Cela conduit d'ailleurs dans certains cas à changer la technique chirurgicale pour des raisons purement économiques [114]. La recherche sur le traitement étiologique de ces maladies rares peut donc apporter des solutions économiquement avantageuses. La thérapie génique est sur ce point particulièrement attirante si le but recherché d'un traitement unique, préventif, et efficace à vie est atteint.

Sur le plan médical, le seul traitement disponible pour ces hépatopathies en fin d'évolution est la transplantation hépatique. La survie des patients transplantés dans ces indications est de l'ordre de 80 % [115]. On sait qu'un des principaux problèmes actuels est la mortalité de patients sur liste d'attente qui peut atteindre 25% [116]. Les nouvelles techniques de foie partagé ou de donneurs vivants n'améliorent que partiellement ces données [117, 118]. De plus, la technique de donneur vivant peut induire une perte de chance lors des maladies génétiques avec atteinte hépatique, où les parents donneurs sont hétérozygotes ce qui induit une morbidité supplémentaire pour le donneur qui peut perdre lors de l'intervention 60% de sa masse hépatique fonctionnelle et pour le receveur qui reçoit un foie qui n'est pas strictement sain [115]. On a aussi vu que pour un des groupes de maladies candidates, la transplantation hépatique est frustrante puisqu'elle implique l'exérèse d'un foie strictement sain histologiquement. C'est pourquoi des traitements alternatifs sont l'objet de recherche depuis plus de 20 ans dans ce domaine.

En effet, sur le plan scientifique, la thérapie génique aurait l'avantage d'apporter une solution curative unique au traitement d'hépatopathies héréditaires variées. Mais en dehors des maladies génétiques déjà citées, nous pouvons anticiper l'utilisation de ces techniques dans plusieurs maladies hépatiques acquises. Par exemple dans le traitement des hépatites virales, on pourrait rendre les hépatocytes réfractaires à la réplication virale [119]. Une des voies étudiées pour le traitement des cancers potentiellement applicable aux hépatocarcinomes est l'activation d'un gène suicide préalablement transféré dans les cellules cancéreuses [120]. Le foie peut être d'autre part protégé des destructions cellulaires massives dans les hépatites fulminantes en manipulant génétiquement les mécanismes d'apoptoses [121]. Comme dans d'autres domaines, le développement des connaissances et des techniques de transfert de gène dans le foie peut induire des retombées positives inattendues.

Enfin, sur le plan éthique, ce concept des maladies rares a été développé car il est justement inconcevable de ne pas chercher de traitements pour ces patients au prétexte que leur maladie est très particulière avec seulement quelques cas par ans et par pays. Et lorsqu'on demande aux français s'il faut investir dans la recherche sur ces maladies génétiques, la réponse est massivement affirmative, ce qui a fait tout le succès du téléthon. Il faut donc chercher des réponses, et la thérapie génique en est la plus logique. Celle-ci induit d'ailleurs un autre versant à la question éthique, qui est

le maintien d'une vigilance permanente sur les risques provoqués par la manipulation génétique, dont les 2 principaux sont l'oncogénèse et la modification des lignées germinales. L'oncogénèse est secondaire à une mutagénèse insertionnelle, dont le risque dépend de plusieurs variables dont celle du type de vecteur utilisé. Ces données récentes vont influencer le choix des vecteurs lors des protocoles cliniques. De même, la modification des lignées germinales sera évitée si l'administration du vecteur est limitée à l'organe cible. Cette vigilance explique la prudence nécessaire lors du passage entre le laboratoire et les essais animaux, et plus encore entre les modèles animaux et les essais cliniques. Il y a comme souvent un équilibre à trouver entre efficacité et sûreté, et malgré toutes les précautions prises, l'histoire récente des essais cliniques de transfert de gène a montré que ce passage pouvait être source de complications parfois mortelle pour les patients. Il est donc primordial d'intégrer ce principe de précaution dès la conception des protocoles de thérapie génique, et nous reviendrons sur l'intérêt des techniques chirurgicales dans ce cadre.

### III MÉTHODES DE TRANSFERT DE GÈNES DANS LE FOIE

#### *a Méthodes*

Plutôt que de remplacer l'ensemble du foie comme dans la transplantation hépatique, l'idée de la thérapie génique est d'apporter uniquement un gène sain permettant de remplacer la fonction du gène déficient, soit directement *in vivo* par des vecteurs porteurs du gène sain injectés dans la circulation sanguine hépatique, soit indirectement *ex vivo*, sur des hépatocytes isolés d'un lobe hépatique réséqué, modifiés génétiquement *in vitro*, et ensuite réimplantés dans le foie.

Ces deux techniques sont possibles d'une part grâce aux propriétés anatomiques et histologiques du foie, et d'autre part grâce au développement de vecteurs permettant ce transfert de gène. Elles ont chacune des avantages et des inconvénients, et il reste encore des étapes expérimentales à franchir puisque malgré le nombre important de travaux dans ce domaine ces dix dernières années, ces techniques ne sont pas encore entrées dans l'arsenal thérapeutique en pratique clinique.

Le foie est une cible intéressante pour *le transfert de gène in vivo* car il est d'emblée accessible via la circulation sanguine. En effet, le flux hépatique sanguin représente 1/5 du débit cardiaque. Une particule injectée dans la circulation sanguine peut donc atteindre très rapidement le foie. De plus, nous avons vu que l'endothélium hépatique était fenestré chez l'homme, avec des orifices endothéliaux de plus de 100 nm de large permettant le passage de macromolécules telles que les particules virales qui peuvent ainsi atteindre aisément les hépatocytes. L'importance de la fenestration de l'endothélium a été montrée dans le cas des tumeurs hépatiques. Celles-ci provoquent en effet une disparition de la fenestration appelée « capillarisation » de l'endothélium qui, associée à l'épaississement de la membrane basale menant à la fibrose hépatique, entraîne une réduction considérable de la transduction hépatocytaire. Plusieurs études ont montré la faible efficacité du transfert de gène par voie portale dans les tumeurs hépatiques, confirmant l'importance de la perméabilité endothéliale [122-124].

L'administration de vecteurs dans la circulation systémique pose le problème de leur dissémination aux autres organes et celui de leur dilution dans la masse sanguine de l'hôte, avec un nombre de particules infectieuses par cellules à infecter (MOI) insuffisant dans le foie quand le titre viral est faible. Afin d'augmenter le nombre de particules atteignant réellement les hépatocytes tout en diminuant la diffusion aux autres organes, notre équipe a développé des méthodes de perfusion sélective du foie après exclusion vasculaire. Nous verrons que cette approche chirurgicale a ensuite été appliquée chez les grands animaux, permettant d'envisager une application clinique.

*Les approches ex vivo* sont possibles puisque les hépatocytes peuvent être isolés et transplantés. Ces techniques *ex vivo* éliminent les inconvénients potentiels inhérents aux transferts de gène *in vivo*, comme la toxicité directe du vecteur, la dissémination du transgène ou les modifications génétiques de cellules qui ne sont pas hépatiques. Ces hépatocytes peuvent être hétérologues ou être des hépatocytes autologues cultivés et modifiés génétiquement *in vitro*. Chez les rongeurs, de nombreuses études à l'origine des thérapies cellulaires ont montré que l'injection des hépatocytes

dans la rate des animaux permettait une migration immédiate vers le foie via le système porte [125]. Ils pénètrent par les branches veineuses portales dans les sinusoides hépatiques proximaux du fait de leur taille importante, et se distribuent donc préférentiellement dans les régions periportales des lobules hépatiques [126]. La plupart des hépatocytes bloqués dans les sinusoides sont détruit par la réaction phagocytaire, mais environ 20% des cellules transplantées allogéniques s'intègrent dans le parenchyme hépatique en une semaine et sont dès lors fonctionnels à vie [32, 127]. Il reste que ces techniques classiques de transplantation hépatocytaire ne permettent une transduction ne correspondant au mieux qu'à 1% de la masse hépatique de l'animal receveur. Ce taux peut suffire pour avoir des bénéfices métaboliques [128]. Les transplantations d'hépatocytes étant possibles chez les bébés, cela ouvre des perspectives de thérapies *ex vivo* dans les stades précoces des hépatopathies métaboliques héréditaires [55]. D'autre part, la répétition des perfusions d'hépatocytes est possible avec une certaine efficacité thérapeutique [55, 129, 130]. Néanmoins, plusieurs stratégies ont été essayées chez l'animal afin d'améliorer le taux de transplantation cellulaire. Lors de la « prise de greffe », il a été montré que l'intégration était meilleure (1) lorsque le foie était en régénération [64], (2) en utilisant des vasodilatateurs permettant l'augmentation du nombre de cellules déposées dans les sinusoides hépatiques [131], (3) en rompant l'endothélium par des drogues comme le cyclophosphamide [132], ou (4) en déplaçant le foie des cellules de Küpffer par du chlorure de gadolinium avant la transplantation [133]. D'autres stratégies visent à augmenter la masse d'hépatocytes transplantés après l'intégration dans le parenchyme hépatique. Le tétrachlorure de carbone, en détruisant sélectivement les hépatocytes centrolobulaires, permet une régénération des hépatocytes portaux et donc des hépatocytes transplantés [134]. L'utilisation de la rétrovirusine ou l'irradiation du foie avant la transplantation dans le but d'inhiber les capacités de régénération des hépatocytes hôtes, associées à une forte pression de régénération après la transplantation par une large hépatectomie et des lésions d'ischémie-reperfusion, permet une repopulation presque complète par les hépatocytes transplantés du foie receveur dans des modèles de transplantation de 0,5% de la masse hépatique du receveur [135-137]. Les techniques de transplantation d'hépatocytes sont possibles chez l'homme [55, 111, 128, 130]. Elles sont néanmoins complexes lorsque l'on veut les appliquer en clinique humaine si des cultures sont nécessaires. Par exemple, la transplantation d'hépatocyte pour une patiente a nécessité  $3 \times 10^9$  cellules soit 800 boîtes de cultures [69]. De nouvelles procédures ont donc été développées pour éviter ces cultures. L'utilisation de vecteur comme les lentivirus ne nécessitant pas de division cellulaire pour infecter les hépatocytes, des techniques de suspension cellulaire sans adhésion en boîte de culture, suivi d'une réimplantation quelques heures après le prélèvement permet d'utiliser presque tous les hépatocytes prélevés et d'obtenir un taux de 3 à 5 % de la masse hépatique de l'animal [138]. Il reste que ces approches *ex vivo* souffrent d'une faible efficacité au prix de protocoles complexes. La guérison de plusieurs des hépatopathies héréditaires citées dans le chapitre précédent demande un taux de transfection de 5 à plus de 30% [1], alors que les essais cliniques de l'équipe de Wilson ont abouti à un hépatocyte transduit sur 10000 [69, 70].

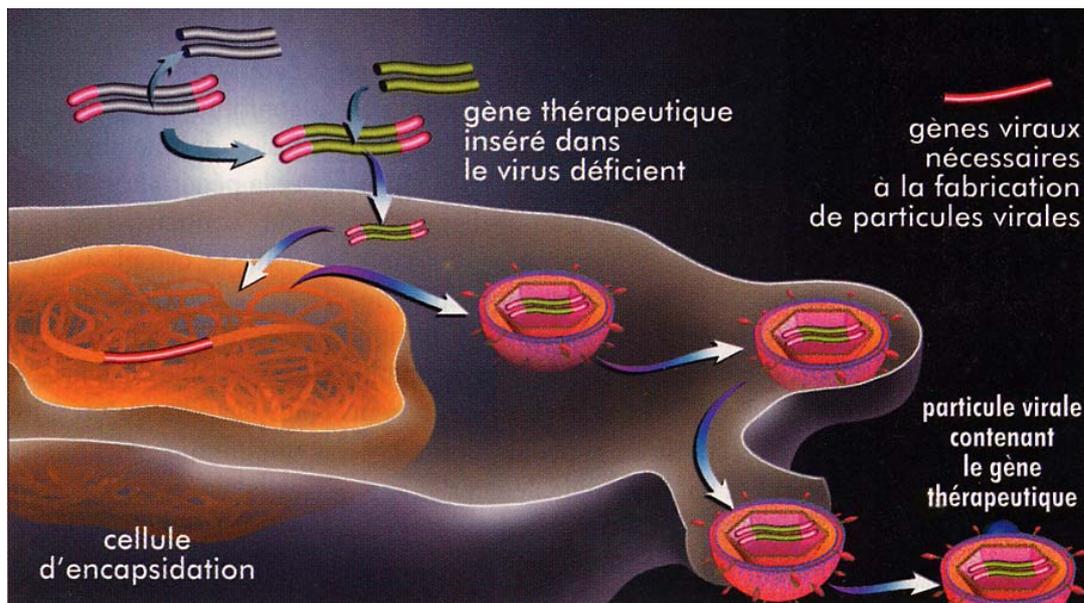
On voit donc que le foie, par ses dispositions anatomiques et sa riche vascularisation, les propriétés de son endothélium, ses possibilités de régénération et sa capacité à intégrer des hépatocytes exogènes, permet le développement de stratégies qui évitent la transplantation hépatique. Les méthodes *in vivo* ont l'avantage de la simplicité et d'une grande efficacité thérapeutique potentielle, mais laissent la possibilité d'infection d'autres tissus que les hépatocytes cibles. Les méthodes *ex vivo* garantissent une sécurité génétique maximale, puisque seuls les hépatocytes transplantés sont modifiés par rapport à l'hôte, mais elles posent le problème de leur efficacité, avec la nécessité de procédures complexes pour atteindre des taux thérapeutiques, procédures dont la tolérance clinique reste à évaluer. Les méthodes chirurgicales de transfert de gène *in vivo* avec une perfusion sélective du vecteur dans le foie après exclusion vasculaire permettraient d'allier l'efficacité thérapeutique des méthodes *in vivo* classiques et la sécurité des méthodes *ex vivo*.

## b Vecteurs

Les vecteurs non viraux ont été les premiers vecteurs construits dans le but de protéger l'ADN nu des dégradations intra et extra-cellulaires. De nombreuses constructions ont été essayées, incluant les

liposomes cationiques ou anioniques [107, 108] et plus récemment le système des phiC31 intégrases [139]. Certaines constructions, comme le système des récepteurs aux asialoglycoprotéines par exemple, étaient capables de cibler préférentiellement les hépatocytes avec cependant une expression du transgène limitée et transitoire [140]. Une avancée récente a été le développement d'une procédure d'injection volumineuse par la veine de la queue des rongeurs [141]. Elle consiste en l'administration d'une solution contenant d'ADN plasmidique nu d'un volume correspondant à 10% du poids de l'animal, en quelques secondes [142]. Le cœur ne pouvant supporter une telle précharge, le liquide contenant l'ADN reflue dans le foie par les veines sus-hépatiques. Cette méthode est maintenant utilisée par de nombreux laboratoires, avec une efficacité de transduction pouvant atteindre 40%. Sa simplicité permet de tester l'efficacité de nouvelles constructions génomiques sans avoir besoin de recourir à la construction d'un vecteur viral. Son efficacité reste en revanche le plus souvent transitoire. Comme cela a été essayé en utilisant des vecteurs viraux [87, 143-145], une méthode intéressante est l'adaptation de cette technique à la perfusion d'un membre isolé, adaptation qui a été entreprise chez les rongeurs, les chiens, et les macaques [146], et qui a été appliquée récemment au rat Gunn pour la correction de la maladie de Crigler Najjar [147]. Les résultats sont encore préliminaires, avec des réinjections possibles mais une perte d'efficacité avec le temps.

*Les vecteurs viraux* sont actuellement considérés comme les outils de transfert de gène dans le foie les plus efficaces. Il s'agit de virus dont tout ou partie du patrimoine génétique a été délété, puis remplacé par un gène thérapeutique. Ils deviennent ainsi défectifs pour la réplication, la construction de l'enveloppe et de la capsid virale ainsi que l'intégration du génome virale modifié se faisant dans des cellules d'encapsulation (figure 9 ci-dessous). De nombreux virus ont été essayés, incluant les virus herpes, ceux de l'hépatite B, ou les baculovirus. Mais les quatre virus les plus prometteurs sont les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus, et les AAV [10].



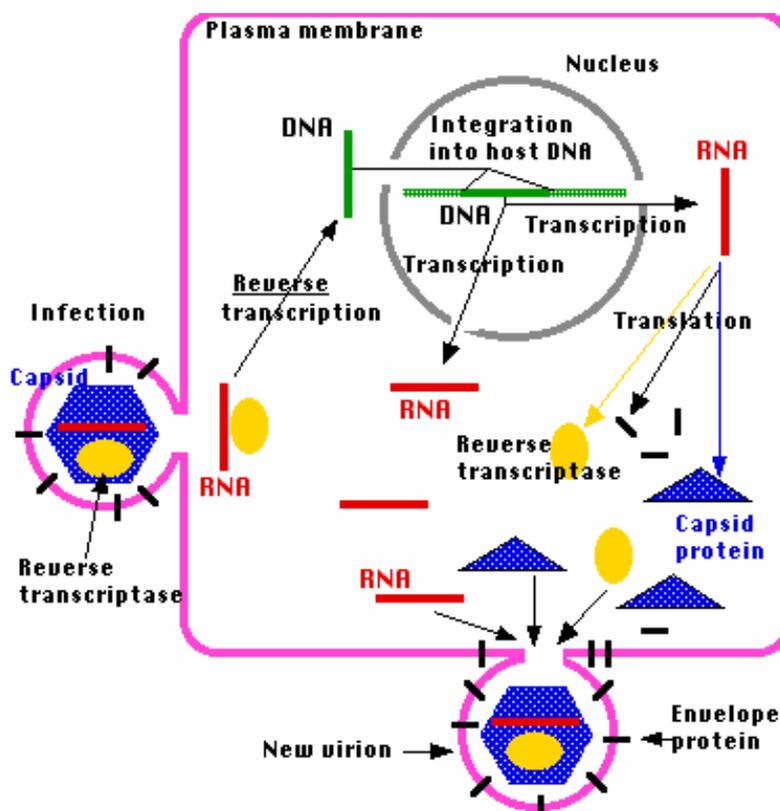
**Figure 9 :** construction de vecteurs viraux recombinants dans les cellules d'encapsulation

Les *adénovirus* sont des virus identifiés depuis les années 50, responsables chez l'homme d'infections ORL, broncho-pulmonaires et de gastro-entérites. Il s'agit de virus non enveloppés avec une capsid icosahédrique de 110 nm de diamètre, dont l'information génétique est portée par un ADN linéaire bicaténaire. Les vecteurs adénoviraux recombinants, délété de la région E1 de leur génome afin qu'ils ne soient pas répliatifs, ont été construit dès la fin des années 80 [148]. Ils ont été très utilisés en raison de leur capacité à infecter les hépatocytes quiescents à un taux important [149, 150]. Il est cependant vite apparu que l'expression du transgène était transitoire du fait de l'élimination des hépatocytes infectés par une réponse immunitaire cytotoxique. Celle-ci était principalement dirigée contre les protéines adénovirales, quoique la réaction contre le produit du transgène était aussi présente dans certaines souches de souris [151].

Deux stratégies ont été développées pour éviter cette réaction immunitaire. La première était une modulation du système immunitaire de l'animal receveur. L'efficacité de drogues comme le

cyclophosphamide, le FK506, le CTLA4Ig ou l'induction d'une tolérance pour le produit du transgène ou les protéines virales, a été montrée [6, 103, 152-156]. La seconde stratégie a consisté à modifier le vecteur lui-même, soit par délétion des séquences codantes les protéines virales (« gutless, gutted, ou helper-dependent adenovirus ») [157, 158], soit par l'expression d'un gène immunomodulateur comme dans les adénovirus non délétés de la région E3, qui exprime une glycoprotéine de 19kDa connue pour interférer avec la réponse immunitaire [159], ou grâce à la co-expression de CTLA4Ig et du transgène [103]. De ces différentes stratégies, l'utilisation des « gutless adenovirus » semble la plus prometteuse car elle a permis d'obtenir dans des protocoles précliniques chez les grands animaux une expression prolongée de la protéine thérapeutique [83, 160, 161]. Un essai clinique a été initié pour le traitement de lymphome cutané humain avec ce type de vecteur [162]. Un travail récent a permis la correction complète et définitive de rats gunn par une injection unique de gutless adénovirus [104]. La dose employée correspondait néanmoins à la dose d'adénovirus délétés en E1-E4 ayant entraîné le décès de l'enfant avec un déficit partiel en OTC [58]. La toxicité de ces gutless adénovirus a été confirmée chez des babouins. Elle était dépendante de la dose injectée, sans rapport avec l'expression de gènes viraux, et liée à l'activation d'une réponse immunitaire ancienne [163, 164]. Il persiste d'autre part des difficultés pour produire de grande quantité de ces virus. Ces deux faits diffèrent une éventuelle application en clinique humaine de transfert de gène dans le foie.

Les rétrovirus sont des virus eucaryotes enveloppés, dont l'information génétique est portée par 2 molécules d'ARN simple brin de petite taille. Ils sont classés en trois familles : les oncovirus, les lentivirus, et les spumavirus. Les rétrovirus ont un cycle répliatif identique quelle que soit leur famille (figure 10 ci-dessous), dans lequel une transcriptase reverse virale permet la fabrication à partir de l'ARN viral d'un ADN double brin ou provirus qui va s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte.



**Figure 10** : cycle répliatif des rétrovirus. Les rétrovirus recombinants sont des oncovirus dérivés du virus leucémogène murin de Moloney, d'un diamètre de 126 nm de diamètre. Ils sont utilisés depuis plus de 15 ans comme vecteurs de transfert de gène, en particulier pour l'hépatocyte. De nombreuses équipes se sont intéressées à ce type de virus du fait de deux qualités importantes. La première est l'absence de réaction immunitaire contre les particules virales, la totalité des trois gènes *gag*, *pol*, et *env*, codant leurs protéines virales ayant été remplacé par les gènes d'intérêt. La seconde est l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte, ce qui permet d'obtenir une

expression du transgène à vie. En revanche, ces virus ne sont capables d'infecter que des cellules en division, car le complexe d'intégration viral ne peut entrer en contact de l'ADN de la cellule hôte que lorsque la membrane nucléaire est dissoute [165]. Cela impose pour transduire le foie *in vivo* d'induire une régénération hépatique. Il est démontré depuis 1991 que la réalisation d'une hépatectomie partielle suivie de l'injection de la solution rétrovirale par la veine porte permettait une transduction hépatocytaire efficace [166]. Le niveau d'expression du transgène était corrélé au titre viral et à l'intensité de la régénération hépatique [167]. D'autre méthode pour induire une prolifération hépatocytaire, telles que l'occlusion de la veine porte, l'administration de facteurs de croissance ou de composants toxiques, ont été utilisés avec succès [168-170].

Néanmoins, l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire constitue un événement potentiellement mutagène. Elle peut conduire à l'activation d'un proto-oncogène par insertion de séquences promotrices. Des travaux récents ont montré que les rétrovirus contrairement aux lentivirus insèrent leur génome préférentiellement dans la zone de démarrage des unités transcriptionnelles [171], ce qui majore statistiquement ce risque d'oncogénèse par mutagenèse insertionnelle. Ce risque a été confirmé lors de l'essai clinique conduit par l'équipe d'Alain Fischer pour le traitement d'enfants ayant un déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X. Un transfert de gène *ex vivo* ciblant les précurseurs hématopoïétiques CD34 des patients a utilisé des rétrovirus recombinants. Ces patients traités ont bénéficié d'une correction de leur déficit et ont pu mener une vie normale sans traitement adjuvant, mais les deux plus jeunes enfants ont présenté 30 et 34 mois après le transfert de gène une leucémie aiguë lymphoblastique T. Il a été montré chez ces patients une intégration du rétrovirus près du promoteur du proto-oncogène LMO2, responsable de la transformation maligne d'un clone de lymphocyte T [172]. Le déficit génétique initial et le jeune âge des enfants auraient considérablement favorisé la prolifération clonale lymphocytaire, ce qui limiterait le risque de mutagenèse insertionnelle à ce contexte particulier [173]. Des travaux récents montrent en effet que les sites d'intégration diffèrent en fonction du type de cellules, de leur maturité, de l'âge du patient, et de la présence ou non d'une maladie génétique sous-jacente [165, 174]. Il semble néanmoins raisonnable en l'état actuel des connaissances de ne pas utiliser ces vecteurs dans des essais cliniques avant de trouver des solutions évitant l'intégration du génome rétroviral sur des sites mutagènes.

*Les lentivirus* ont été évalués plus récemment pour la transduction d'hépatocytes. Ce sont des rétrovirus dérivés du HIV. Contrairement aux oncovirus, ils sont capables d'infecter des cellules quiescentes en phase G1 du cycle cellulaire, car leur complexe d'intégration viral peut pénétrer dans le noyau avec une membrane nucléaire intacte [165]. Comme tous les rétrovirus, leur génome est intégré dans celui de la cellule hôte [175, 176]. Mais les essais ont montré qu'ils infectaient difficilement les hépatocytes adultes au stade G0 du cycle. Une barrière d'espèce spécifique des temps précoces de l'infection par des virus HIV, qui a été observé dans plusieurs variétés de lignées cellulaires de mammifères non humains et de rongeurs, peut aussi expliquer cette faible infectivité des lentivirus chez les rongeurs [138, 177]. Une stimulation des hépatocytes pour les faire entrer dans le cycle cellulaire augmente considérablement la transduction, ainsi qu'une modification de leur structure par une base purique, d'où leur intérêt actuel dans les transferts de gène *in vivo* [68, 110, 178-180]. Ils ont néanmoins plusieurs inconvénients qui vont nécessiter des travaux complémentaires avant d'envisager une application clinique. Le premier est leur taille, 133 nm de diamètre, qui rend leur passage à travers les pores de l'endothélium hépatique théoriquement plus difficile que pour les autres vecteurs viraux. Le second est le fait qu'ils infectent préférentiellement les cellules de Küpffer plutôt que les hépatocytes dans les techniques de transfert de gène *in vivo*. Une équipe hollandaise a ainsi montré que l'utilisation du chlorure de gadolinium, qui inactive les cellules de Küpffer, multipliait par 7 le taux de transfection hépatocytaire par les lentivirus chez la souris [181]. Le troisième inconvénient est leur intégration au génome de la cellule hôte, qui pose comme pour les oncovirus le problème de la mutagenèse insertionnelle. Les lentivirus intègrent préférentiellement des gènes actifs, mais ils ne ciblent pas la région en aval des sites de départ de la transcription des proto-oncogènes, contrairement aux oncovirus [174]. Le risque de mutagenèse insertionnelle est donc théoriquement inférieur, mais le risque d'interruption d'un gène régulier est lui supérieur [165]. Les travaux actuels sur des lentivirus non intégratif permettront peut-être de les rapprocher de l'étape clinique de transfert de gène *in vivo*.

Les virus adeno-associés ou AAV sont des parvovirus humains défectifs, c'est à dire non pathogène pour l'homme. Ce sont des virus non enveloppés à ADN monocaténaire, qui ont besoin pour leur réplication d'un virus auxiliaire comme l'adénovirus, d'où leur nom. Les AAV recombinants représentent des outils très intéressants de transfert de gène dans le foie. De la même façon que pour les rétrovirus, ils sont délétés des gènes codant les protéines virales. Ils n'induisent donc a priori pas de réponse immunitaire contre les cellules transduites vis à vis de ces protéines virales, contrairement aux adénovirus recombinants classiques. Une étude a même découvert que ces vecteurs peuvent être tolérogènes pour des protéines étrangères après leur administration dans le foie [182]. De nombreux travaux ont montré que les AAV sont capables de transduire des hépatocytes pour une longue période dans des modèles animaux de différentes tailles [79, 81, 82]. Plusieurs sérotypes viraux sont connus. Le plus utilisé a été le sérotype 2, mais des sérotypes 7 et 8 ont été découvert récemment [183]. Il a été montré que le sérotype 8 pouvait être le plus efficace pour infecter le foie [184-188]. Leur petite taille de 26 nm est un avantage pour traverser les fenêtrés de l'endothélium hépatique, mais elle limite leur capacité nucléique, ne permettant le transport que de petits gènes d'environ 5 kb [1]. Comme les AAV sont relativement faciles à produire, des essais cliniques ont déjà été mis en œuvre. Nous avons vu que dans le cadre de l'hémophilie sévère, trois protocoles de transfert de gène *in vivo* par des AAV recombinants ont inclus un total de 18 patients (tableau 3 p 24). Ces patients n'ont pu encore bénéficier d'un taux thérapeutique de facteur anti-hémophilique stable, l'expression du transgène étant restée transitoire [93, 189, 190]. Mais ces travaux ont confirmé que ce vecteur était très bien supporté sur le plan clinique, sans aucun effet secondaire notable que ce soit après une injection intramusculaire ou une perfusion intra-artérielle hépatique. Sur le plan éthique, il s'agit donc actuellement du meilleur vecteur utilisable pour un essai clinique.

Plusieurs vecteurs sont donc maintenant disponibles pour permettre un transfert de gène sans destruction des cellules transduites par une réaction immunitaire dirigée contre les protéines virales. Il reste néanmoins une étape à franchir avant l'application clinique. L'amélioration des méthodes de transfert de gène a en effet fait découvrir depuis quelques années un autre type de réaction immunitaire contre les cellules transduites, dirigée cette fois contre le produit du transgène.

**Tableau 5** : Revue des principaux vecteurs disponibles pour les techniques de transfert de gène dans

	<u>Avantages</u>	<u>Inconvénients</u>	le foie <i>in vivo</i> (d'après Brunetti 2005 [1]).
Plasmides nus	Pas de réponse inflammatoire Capacité de clonage importante Expression à long terme Préparation facile	Faible efficacité de transduction Méthodes de délivrance à développer	IV
Adénovirus	Capacité de clonage importante Haut niveau de transduction Expression à long terme (gutless)	Toxicité aiguë	IMM
Rétrovirus	Pas de réponse immunitaire virale Expression à long terme	Mutagenèse insertionnelle Transduction des seules cellules en division	UNI
Lentivirus	Pas de réponse immunitaire virale Expression à long terme	Intégration dans les gènes actifs Grande taille	TÉ
AAV	Expression à long terme	Capacité de clonage limitée Réponse immunitaire adaptée à la capsid	ET
			RAP
			IE
			GÉ
			NIQ
			UE

### *Réaction immunitaire contre les protéines virales*

Le rôle du système immunitaire a été évoqué en premier lieu lors de l'utilisation des adénovirus recombinants. Ceux-ci ne permettaient qu'une expression transitoire du transgène, excepté dans les études chez les animaux nouveaux-nés, chez les animaux immunodéficients, ou dans les organes « immunoprivilégiés » comme la rétine [191]. Ces exceptions ont suggéré que le système immunitaire jouait un rôle primordial dans ce caractère transitoire de l'efficacité du transgène. Des travaux ont ensuite confirmé qu'une réaction immunitaire cytotoxique était spécifiquement dirigée contre les protéines adénovirales exprimées par les hépatocytes transduits [192]. Ces adénovirus recombinants avaient en effet l'inconvénient d'avoir gardé une partie de leurs génomes codant certaines protéines virales. Celles-ci étaient exprimées par la cellule, reconnues du système immunitaire de l'hôte, et elles provoquaient une réaction cytotoxique détruisant les cellules transduites.

Les autres vecteurs viraux, y compris les adénovirus « gutless », n'ont pas cet inconvénient puisque leur génome est délété de séquences codant les protéines virales. L'injection par voie systémique de ces vecteurs viraux déclenche une réaction immunitaire contre les protéines de la capsid virale, ce qu'ont confirmé les études récentes utilisant des AAV chez les primates [186, 193]. Mais toutes les études réalisées chez l'animal n'ont pas montré de destruction des cellules transduites par cette réaction immunitaire dirigée contre les protéines virales. En effet, les éléments de la capsid virale sont détruits dans les cellules hôtes avant que la réaction immunitaire soit efficace, et l'absence de synthèse de nouvelles protéines virales par le génome de ces vecteurs empêche une réaction cytotoxique secondaire. Notre groupe utilise par exemple depuis de nombreuses années les rétrovirus recombinants, sans n'avoir jamais mis en évidence de réaction immunitaire détruisant les cellules hôtes et ciblée contre des éléments de l'enveloppe virale (cf infra). L'application d'un protocole de transfert de gène *in vivo* en utilisant des AAV 2 chez des patients hémophiles a montré en revanche une expression transitoire du transgène du fait d'une réaction immunitaire cytotoxique dirigée contre les protéines virales [92, 93]. Deux facteurs ont provoqué cette réaction immunitaire particulière à l'homme. Le premier est une élimination lente de la capsid virale des AAV2 dans les hépatocytes transduits. Le second est la présence chez la majorité des patients d'une immunité ancienne, les AAV étant des virus co-infectant avec les adénovirus les patients dans la petite enfance. Cette immunité naturelle est mobilisable beaucoup plus rapidement du fait des lymphocytes T à mémoire, ce qui mène à la destruction des hépatocytes avant l'élimination des éléments de la capsid de l'AAV 2. Les inconvénients de cette réaction immunitaire dirigée contre les protéines virales avec ces vecteurs n'ayant pas de séquences codant les protéines virales sont donc (1) l'impossibilité d'envisager des réinjections avec le même vecteur dès l'apparition des anticorps dirigés contre lui et (2) le déclenchement d'une réaction inflammatoire cytotoxique s'il existe une immunité ancienne pré-existante. Ce deuxième phénomène a été montré pour les adénovirus [194] et les AAV de sérotype 2 [188], et il nécessite la détection d'une immunité ancienne dirigée contre les protéines de la capsid du vecteur avant tout essai clinique ou pré-clinique chez les primates. Si cette immunité ancienne existe, il faudra probablement envisager une immuno-modulation transitoire le temps que la capsid virale s'élimine des hépatocytes [93].

### *b Réaction immunitaire contre le produit du transgène*

Il est apparu avec l'utilisation de rétrovirus à haut titre que l'efficacité de la transduction était certes excellente, pouvant être supérieure à 50% [167], mais qu'elle devenait aussi transitoire [195], alors qu'avec des titres plus faibles, l'expression du transgène était inférieure à 5%, mais permanente [166]. Ce caractère transitoire n'était pas dû à une extinction du promoteur puisque l'analyse de l'ADN recombinant par PCR démontrait une disparition totale du transgène. Cette disparition était concomitante de l'apparition sur les coupes histologiques d'une inflammation du parenchyme hépatique avec des lymphocytes T cytotoxiques. Le fait que cette inflammation n'apparaisse pas chez des animaux normaux traités par des anticorps anti-CD8 confirmait une élimination immunitaire cytotoxique des hépatocytes transduits. Celle-ci n'était pas non plus retrouvée chez des animaux transgéniques pour la beta-galactosidase lorsque le transgène codait pour cette protéine [196]. Les animaux transgéniques étant tolérants à la beta-galactosidase mais à aucune des protéines rétrovirales, cette observation démontrait que la cible réelle de la réaction immunitaire était bien dans

ce cas le produit du transgène lui-même. On a observé que cette réaction immunitaire cytotoxique était accompagnée de l'apparition d'anticorps spécifique du produit du transgène, dirigés par exemple contre la BGT1 chez les rats Gunn, modèle de la maladie de Crigler-Najjar [196].

Cette réponse contre le produit du transgène a été retrouvée pour les autres vecteurs viraux ; les adénovirus [151], les lentivirus [197], les AAV [198]. Cette réponse peut concerner le gène thérapeutique mais aussi les protéines transactivatrices incluses dans la construction transgénique [199]. D'autre part, l'intensité de la réaction cytotoxique dépend de l'organe cible, et à ce titre, le foie y est particulièrement sensible. En effet, chez des animaux immunisés, les hépatocytes transduits sont éliminés alors que l'expression du transgène reste présente dans d'autre organe moins sensible à l'attaque immunitaire cytotoxique. Notre groupe a démontré par exemple que des muscles infectés avec des AAV exprimaient de manière permanente la beta-galactosidase chez des animaux pour lesquels une élimination par une réaction immunitaire cytotoxique d'hépatocytes transduits par des rétrovirus codant la même protéine était survenue [200]. Ce résultat était obtenu quelle que soit la séquence d'administration des vecteurs, rétrovirus dans le foie puis AAV dans le muscle un mois plus tard ou l'inverse, AAV puis rétrovirus. La même observation a été faite pour les cellules rétinienne exprimant la beta-galactosidase de manière permanente chez des animaux immunisés contre celle-ci lors d'une réaction immunitaire cytotoxique contre des hépatocytes infectés par des rétrovirus [201]. Une des explications à cette différence inter-organe serait le caractère fenêtré de l'endothélium hépatique permettant le passage des lymphocytes T circulants, alors que l'endothélium continu du muscle ou de la rétine aurait un rôle protecteur contre l'attaque immunitaire.

Deux mécanismes ont été invoqués pour expliquer cette réaction immunitaire contre le produit du transgène. Le premier est une infection des APC par le vecteur. Dans ce cas, le transgène s'exprime dans les APC comme il le ferait dans les hépatocytes, mais le produit du transgène dans ces cellules se comporte alors comme un antigène, déclenchant une réaction immunitaire humorale et cytotoxique. Ce mécanisme a été rapporté pour les rétrovirus après injection musculaire [202, 203] et pour les lentivirus après injection systémique [197]. Ce mécanisme impliquant les APC peut être évité par l'utilisation dans la construction virale de promoteur spécifique à l'organe cible. Lors de l'infection des APC par le vecteur, le transgène ne peut s'exprimer puisque son promoteur ne fonctionne pas, interrompant ainsi le processus immunitaire. Cette méthode a été appliquée avec succès avec des adénovirus [204] et des lentivirus dans le foie [85], et des rétrovirus dans le muscle [205]. Plusieurs travaux ont montré que les AAV déclenchaient des réactions immunitaires contre le produit du transgène, notamment dans des études à but vaccinal [206, 207]. Pourtant d'autres études ont montré que ces AAV recombinants n'infectaient pas les APC [198, 208, 209]. Cette absence d'infection des APC par les AAV dépend néanmoins de la dose et du sérotype viral utilisé, puisqu'un travail récent avec des AAV8 dans le foie de souris a montré que l'utilisation d'un promoteur spécifique était nécessaire pour éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire cytotoxique dans ce protocole [11]. L'absence d'infection des APC lors des premiers travaux a mené à invoquer un autre mécanisme. Les lignées cellulaires productrices des vecteurs recombinants sécrètent aussi les protéines, produit du transgène, qui sont donc présentes dans le surnageant. Lors de l'injection de ce surnageant viral dans l'animal, ces protéines agissent comme des antigènes. Elles sont captées par les APC, ce qui déclenche une réaction immunitaire avec une composante humorale via l'activation des lymphocytes Th2 [209] et une composante cytotoxique via un mécanisme de « cross-présentation » [198]. Une des méthodes envisagées pour empêcher cette réaction serait donc de purifier le surnageant avant l'administration du vecteur *in vivo*. Cette réaction immunitaire peut d'autre part être influencée par l'organe cible et la voie d'injection, avec par exemple des anticorps apparaissant après injection intramusculaire d'AAV recombinants chez la souris, alors qu'une expression à long terme dans le foie est obtenue sans anticorps ni réaction cytotoxique après injection intraveineuse dans le même modèle [210].

Au vu de ces différents résultats, il est parfaitement établi que l'on doit éviter cette réaction immunitaire contre le produit du transgène si l'on veut obtenir un traitement efficace à long terme de maladies génétiques héréditaires du foie. Dans le cadre du transfert de gène dans le foie *in vivo* par des rétrovirus recombinants, deux études récentes confirment ce fait. La première concerne la mucopolysaccharidose de type VII, ou l'équipe de Kathy Ponder et Mark Haskins a utilisé un modèle de chien avec un déficit en beta-glucuronidase [9]. Dans ce modèle, le déficit génétique résulte d'une

mutation ponctuelle d'un seul acide aminé, provoquant une absence d'activité de l'enzyme qui est néanmoins sécrétée. En conséquence, la protéine thérapeutique codée par le transgène, différant uniquement par un acide aminé de la protéine native mutée, a été reconnue comme appartenant au soi et n'a pas déclenché de réponse immunitaire. Dans cette expérience, l'administration de vecteurs rétroviraux contenant le gène de la beta-glucuronidase par injection systémique dans des chiens nouveau-nés a permis une correction complète et permanente du déficit génétique. La seconde étude réalisée par notre groupe a consisté en une immuno-modulation par l'administration de CTLA4Ig ou de LF-15-0195 lors de l'injection de rétrovirus recombinants codant un gène marqueur, ces deux molécules étant utilisées en pratique clinique pour induire une tolérance lors de transplantation d'organe [5]. Le CTLA4Ig et le LF-15-0195 étaient injectés pendant les 8 premiers jours qui ont suivi le transfert de gène. Dans un autre groupe de rat, une co-infection par des adénovirus recombinants dont le transgène exprimait le CTLA4Ig a permis l'expression de celui-ci. Plusieurs animaux de chaque groupe ont montré une expression à long terme du transgène, avec une plus grande efficacité pour le CTLA4Ig à dose importante ou via la co-infection adénovirale. Ces deux études ont donc montré que le transfert de gène dans le foie *in vivo* par des rétrovirus recombinants est parfaitement efficace lorsque la réponse immunitaire est contrôlée.

## TRAVAIL

### 1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Au début des années 90, Nicolas Ferry & Coll. ont développé une technique *in vivo* de perfusion de vecteurs viraux sur un foie exclu de la circulation sanguine chez des rongeurs [166]. Un des premiers objectifs de cette technique chirurgicale était d'augmenter la concentration des vecteurs au niveau du foie tout en limitant de manière importante la diffusion de ceux-ci aux autres organes de l'animal. En utilisant des rétrovirus, cette augmentation de la MOI permettait d'atteindre des taux d'infections de l'ordre de 5% des hépatocytes, avec une transduction efficace à long terme. Ces résultats ont été confirmés chez le rat Gunn, modèle de la maladie de Crigler Najjar [105, 106]. L'absence de diffusion du vecteur rétroviral limitait d'autre part le risque de mutagenèse insertionnelle et de modification des lignées germinales. De plus, comparé à la transplantation hépatique, on pouvait considérer comme acceptables en clinique humaine ces techniques de foie isolé-perfusé qui étaient utilisées depuis plusieurs années dans le traitement de certaines tumeurs hépatiques [211].

La fabrication de nouvelles lignées rétrovirales à haut titre a permis d'atteindre dans le foie receveur de rat des taux d'infection de plus de 50%, par une simple injection intraveineuse périphérique 24 heures après une hépatectomie de réduction [167]. Il n'était donc plus nécessaire d'augmenter la MOI par des techniques chirurgicales. Néanmoins, l'apparition d'une réaction immunitaire contre le produit du transgène a fait rechercher des méthodes pour éviter cette réaction et induire une tolérance. Nous avons émis l'hypothèse qu'en limitant la diffusion du vecteur à l'ensemble de l'organisme et donc aux organes impliqués dans le système immunitaire par la technique du foie isolé-perfusé, nous obtiendrions une atténuation de cette réaction.

Un second aspect émergeait alors avant d'entreprendre une application clinique. Nous n'avions appliqué la technique de foie isolé perfusé que chez des petits animaux. Or une étape pré-clinique importante consiste à tester les protocoles chez les grands animaux. Cette étape est primordiale puisqu'un certain nombre de paramètres change avec des résultats constatés qui sont parfois bien loin de ceux attendus. Dans l'hypothèse où la diffusion des vecteurs dans l'ensemble de l'organisme n'était pas acceptable pour des raisons immunologiques, voire pour des questions éthiques, pouvait-on appliquer les techniques de foie isolé-perfusé dans d'autres modèles animaux que le rongeur et notamment chez les primates ? D'autre part, dans le cadre du transfert de gène dans le foie par des rétrovirus recombinants, une des questions essentielles était l'intensité de la régénération hépatique chez les grands animaux dont la taille était comparable à celle de l'homme, cette régénération étant indispensable à l'intégration du vecteur rétroviral dans les hépatocytes entrés dans le cycle cellulaire. Ce vecteur rétroviral, qui avait beaucoup de qualité chez le rat où la régénération hépatique était intense et rapide, pouvait-il être utilisé dans des modèles de gros animaux puis chez l'homme ?

Notre travail sur l'amélioration de la technique chirurgicale du foie isolé-perfusé pour aboutir à une utilisation clinique du transfert de gène dans le foie avait donc un double objectif :

Appliquer cette approche chirurgicale de foie isolé-perfusé en utilisant un surnageant rétroviral chez le rat, puis évaluer la réponse immunitaire contre le produit du transgène, dans le but d'obtenir une expression à long terme de celui-ci.

Adapter à deux modèles de gros animaux, l'agneau et le macaque, les techniques chirurgicales de transfert de gène dans le foie connues chez les rongeurs et en évaluer l'efficacité et la tolérance.

Cette double logique inspirera le plan de ce chapitre, même s'il ne respecte pas l'ordre chronologique des travaux, l'étude sur les agneaux précédant le travail sur la réponse immunitaire chez le rat et l'étude préliminaire sur les macaques.

## 2 TRANSFERT DE GÈNE SUR FOIE ISOLÉ-PERFUSÉ ET IMMUNITÉ

### *a Comparaison entre injection périphérique et foie isolé-perfusé*

Dans une première étape, nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'isolation du foie de la circulation systémique pendant l'injection d'un surnageant rétroviral à haut titre diminuait la réaction immunitaire contre le produit du transgène. En effet, en limitant la diffusion du surnageant viral au niveau des organes systémiques « immunitaires » (rate, thymus, ganglions), nous voulions éviter le déclenchement de la réaction immunitaire. Rappelons que deux mécanismes sont évoqués dans ce déclenchement, l'infection des APC par le vecteur, et les mécanismes de « cross-présentation » avec le produit du transgène présent dans le surnageant viral. Ces mécanismes pouvaient-ils fonctionner quand seul le foie était en contact avec le surnageant rétroviral ?

Le gène choisi était un gène marqueur codant la beta-galactosidase d'*Echerichia Coli*, couplé à un signal de localisation nucléaire, permettant d'objectiver par une simple réaction colorimétrique sur des coupes histologiques le nombre d'hépatocytes ayant reçu le gène. Cette protéine avait l'avantage d'être très immunogène ce qui plaçait l'expérimentation dans les conditions les plus difficiles pour obtenir une tolérance immunitaire.

En dehors du mode d'administration, les modalités du transfert de gène étaient utilisées en routine dans notre laboratoire. Les animaux étaient des rats Wistar. Le vecteur était un rétrovirus recombinant à haut titre. Une hépatectomie des deux tiers était réalisée afin d'induire la régénération hépatique nécessaire à l'intégration rétrovirale, suivie 24 heures plus tard de l'injection du surnageant.

La voie d'injection veineuse périphérique a été comparé à la technique du foie isolé-perfusé (figure 11 page suivante). Pour cette dernière technique, différentes dilutions du surnageant rétroviral ont été testées, afin d'évaluer la relation entre la charge virale et la réaction immunitaire.

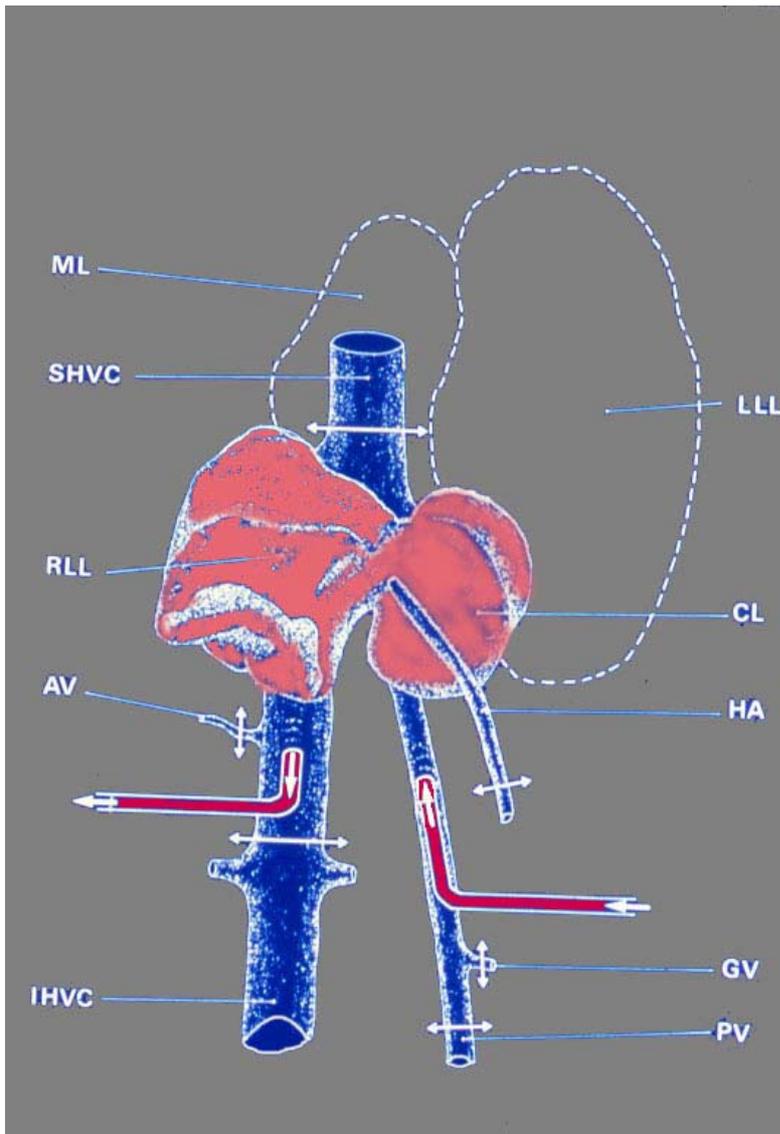


Figure 11 : Schéma de la technique de foie isolé-perfusé chez le rat, après hépatectomie de réduction préalable

ML Median Lobe; SHVC Supra Hepatic Vena Cava; LLL Left Lateral Lobe; RLL Right Lateral Lobe; CL Central Lobe; HA Hepatic Artery; AV Adrenal Vein; GV Gastroduodenal Vein ; IHVC Infra Hepatic Vena Cava ; PV

## MAIN TOPIC

Guillaume Podevin · Virginie Pichard · Sophie Durand  
Dominique Aubert · Yves Heloury · Nicolas Ferry**In-vivo retroviral gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can it be avoided?**Accepted: 28 November 2001 / Published online: 25 September 2002  
© Springer-Verlag 2002

**Abstract** Highly efficient retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo* has been previously reported in rats, but some reports described transient expression of the transgene that may be related to induction of an immune response against the transgene product. To devise a surgical approach to circumvent this drawback, two-thirds partial hepatectomy was performed in Wistar male rats to induce the hepatocyte division required to achieve retrovirus integration. Delivery of amphotropic retroviral vectors (RVV) encoding *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase was performed 24 h after partial hepatectomy. In a first group ( $n = 11$ ), gene delivery was performed by peripheral injection of 2 ml retrovirus-containing medium. For the second group ( $n = 11$ ), asanguineous perfusion of the regenerating liver after complete vascular exclusion was carried out with 20 ml viral solution. Liver biopsies were performed sequentially in each group. In the first group,  $\beta$ -galactosidase was expressed at day 7 in  $7 \pm 6.3\%$  of hepatocytes and the labeled hepatocytes had disappeared in less than 4 weeks. Polymerase chain reaction experiments demonstrated the elimination of the transduced cells and the appearance of antibodies against  $\beta$ -galactosidase. Of the 11 rats in the second group, 8 were still able to express  $\beta$ -galactosidase more than 6 weeks after asanguineous perfusion with no detectable

antibody response. Asanguineous perfusion of the regenerating liver with RVV after complete vascular exclusion enabled long-term expression in rats and avoided the immune response present after peripheral delivery in most animals. These results suggest that the immune reaction is secondary to viral infection of antigen presenting cells. Asanguineous perfusion could thus be a way to perform gene therapy for inherited liver diseases without immunosuppressive therapy.

**Keywords** Gene therapy · Liver · Retroviral vector · Immune response

**Introduction**

Gene therapy for inherited diseases relies on transfer and expression of a therapeutic gene to diseased target cells [18]. Ideally, gene therapy should result in indefinite synthesis of a fully-active therapeutic protein with complete physiologic regulation of its activity, and many strategies have been devised during the past years to attain this goal. We have particularly focused our interest on *in-vivo* gene transfer to the liver using recombinant retroviral vectors (RVV), defective murine retroviruses that have been engineered to contain a marker or therapeutic gene inside their genome [17]. These vectors are able to infect actively-dividing cells and transfer and integrate their transgene into the infected cell's genome.

Since RVV are only able to infect dividing cells, two alternative strategies have been devised to transduce hepatocytes. The first, referred to as *ex-vivo*, relies on infection of hepatocytes in culture with subsequent reimplantation of the corrected cells via the portal vein (PV). Although applicable to humans, this approach has not yielded convincing therapeutic results [8, 9]. The other strategy is aimed at transducing hepatocytes *in vivo*. RVV are delivered to the portal blood stream after liver regeneration has been induced to trigger hepatocyte replication. Various chemical (toxic or mitogenic) or

G. Podevin (✉) · V. Pichard · S. Durand · D. Aubert · N. Ferry  
Laboratoire de Thérapie génique,  
CHU Hotel Dieu, Blv. Jean Monet,  
44093 Nantes cedex 1, France  
E-mail: guillaume.podevin@chu-nantes.fr  
Fax: +33-240-083 546

G. Podevin · Y. Heloury  
Service de chirurgie infantile,  
HME, CHU Hotel Dieu, 7 quai Moncoussu,  
44093 Nantes cedex 1, France

G. Podevin  
HME, CHU Hotel Dieu,  
7 quai Moncoussu,  
44093 Nantes cedex 1 France

physical (partial hepatectomy, vascular occlusion) means may be used to induce replication [5].

In rat liver, two-thirds partial hepatectomy is the gold standard to induce liver regeneration, since many parameters regarding the kinetics and extent of liver regeneration in these settings have been studied [7]. We and others have demonstrated that recombinant RVV injected into the PV 24 h after partial hepatectomy (i.e., at the peak of hepatocyte division) could efficiently transduce hepatocytes and allow expression of the transgene [6, 13]. Initially, using RVV with low titers ( $10^5$  to  $10^6$  infectious particles/ml), we showed that in-situ asanguineous perfusion of the regenerating liver made it possible to achieve long-term expression of the transgene in up to 0.5% of the hepatocytes [1]. Subsequently, we showed that the level of expression was correlated to the extent of liver regeneration as well as to the viral titer [2, 14]. However, when using high-titer RVV, long-term expression of the transgene was no longer obtained [4].

Since gene transfer results in the expression of a foreign protein, induction of an immune response directed against the transgene product is expected. Indeed, many studies have documented induction of a cytotoxic immune response directed against transduced hepatocytes after delivery of recombinant adenoviral vectors [24]. Using RVV, we recently documented that a cytotoxic immune response also appeared after delivery of high-titer vectors to the dog liver via a peripheral vein [12]. Therefore, strategies aimed at evading induction of an immune response are needed to achieve long-term expression of a transgene at a therapeutic level. Although the mechanism whereby RVV trigger the immune response is still not known, it has been proposed that this type of vector could infect antigen-presenting cells [11, 22]. We therefore reasoned that perfusion of the liver after vascular exclusion could reduce delivery of viral vectors to the blood stream and decrease induction of an immune response.

In the present study, we showed that asanguineous perfusion of the liver with high-titer RVV resulted in sustained  $\beta$ -galactosidase expression because of the absence of an immune response in many animals.

## Materials and methods

Male Wistar rats weighing 180–200 g (Iffa Credo, L'asbresle, France) were maintained under a 12-h light cycle and fed ad libitum. All surgical procedures were conducted on deeply anesthetized animals according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture. Rats were anesthetized by isoflurane (3% in air) inhalation.

Two-thirds partial hepatectomy was performed by removing the two main liver lobes after ligation at the hilum according to the procedure of Higgins and Anderson [10].

Retroviral delivery was performed 24 h after partial hepatectomy.

Asanguineous perfusion of the regenerating liver after complete vascular exclusion was carried out as previously described [6]. Rats

were laparotomized and the liver was excluded from the systemic circulation by clamping the PV and the supra- and infrahepatic vena cava. The gastroduodenal vein was ligated and sectioned. The PV was cannulated and 20 ml viral supernatant was infused over 5 min. The viral supernatant was harvested from the infrahepatic vena cava. The liver was rinsed with 10 ml saline and the circulation was restored after suturing the vessels. A blood sample was drawn a few minutes after declamping the liver and the serum virus titer was assayed by end-point dilution using Te671 cells and counting the number of positive colonies after X-Gal staining as described [6].

Peripheral delivery was carried out by direct injection via a peripheral vein of 2 ml retrovirus-containing medium.

Seven days after retroviral injection, liver biopsies were performed. Rats were anesthetized and laparotomized to expose the remnant liver lobes. A liver fragment (approx. 10 mg) was obtained from one lobe. Each sample was paraffin-embedded after fixation in formalin.

### Retroviral vectors

The TELCeB6 AF7 cell line (referred to as TA7) produced recombinant RVV carrying a nls-lacZ reporter gene encoding *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase coupled to a nuclear localization signal (nls) and inserted in the proviral plasmid pMFG [3]. The reporter gene transcription was under the control of the retroviral long terminal repeat (LTR).

A 24-h recombinant retroviral supernatant was harvested from the confluent producer cell line and filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane. Before use, 8  $\mu$ g/ml polybrene (hexamethedrine bromide, Sigma, St. Louis, MO) was added to the supernatant.

Titers were determined by end-point dilution using Te671 cells and the number of blue colonies after X-Gal staining were counted. The titer was routinely  $10^8$  colony-forming units (cfu)/ml.

### Immunohistochemistry

The presence of  $\beta$ -galactosidase was assessed by immunohistochemistry on formalin-fixed/paraffin-embedded sections (5  $\mu$ m). Sections were deparaffinized and endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in a 3%  $H_2O_2$  solution in phosphate-buffered saline (PBS). Polyclonal primary anti- $\beta$ -galactosidase antibody diluted 1:2,000 in PBS was applied overnight at 4 °C. Positive cells were visualized with biotinylated anti-mouse immunoglobulin and streptavidin-peroxidase using AEC as a chromogenic substrate. Slides were counterstained with hematoxylin and the percentage of positive cells was calculated.

### Antibody detection

The presence of serum antibodies directed against  $\beta$ -galactosidase was carried out by ELISA. In brief, 96-well dishes were coated overnight at 4 °C with commercially available  $\beta$ -galactosidase 10 mg/ml. After rinsing with PBS/tween (0.5% v/v), serial dilutions of the serum were incubated for 1.5 h at 37 °C. After washing with PBS-tween, the presence of antibodies was revealed using biotinylated anti-rat IgG immunoglobulin and streptavidin/peroxidase.

### Polymerase chain reaction (PCR) analysis

High-molecular-weight DNA was prepared from liver using standard protocols and subjected to PCR amplification using two primers complementary to DNA sequences located in the nls- $\beta$ -galactosidase gene (5'-CGA TTA AGT TGG GTA ACG CCA-3') and MFG backbone (5'-ATA CAC GCC CAC GTG AAG-3'). PCR was carried out in 50  $\mu$ l amplification buffer containing 750 ng genomic DNA, 0.5  $\mu$ M of each primer, 2.5 IU Thermus aquaticus (Taq) polymerase, 1.5 mM  $MgCl_2$ , and 200  $\mu$ M of each

dNTP. Samples were denaturated at 94 °C for 5 min and submitted to 32 cycles of amplification; 94 °C for 30 s for denaturation; 61 °C for 45 s for hybridization; and 72 °C for 1 min for elongation for  $\beta$ -galactosidase, which resulted in amplification of a 311-bp-long  $\beta$ -galactosidase fragment. A positive control was performed by amplification of a 202-bp fragment of the rat phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK) gene promoter using the two primers: 5'-GTC ATA TTT CTT CAG CTT GCG G-3' and 5'-ATA ATG GTC TGG ACT TCT CTG C-3'.

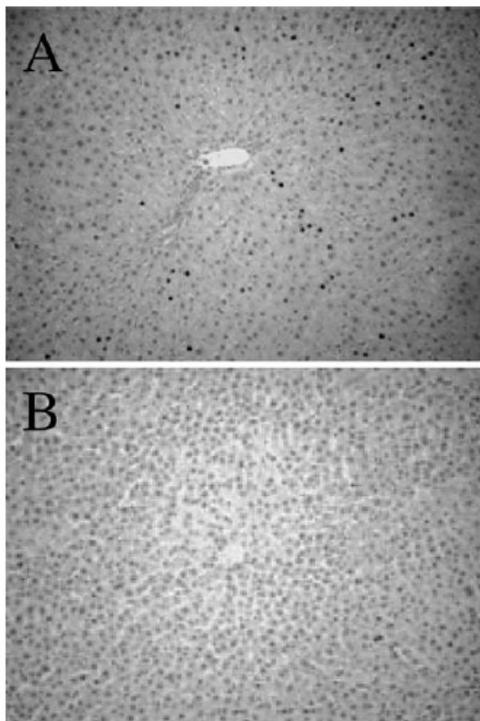
## Results

We first assessed the kinetics of  $\beta$ -galactosidase expression after peripheral injection of the RVV. A first cohort of 11 rats was subjected to partial hepatectomy and received RVV via a peripheral vein. We observed that  $7 \pm 6.3\%$  positive hepatocytes were present in the liver at day 7 on surgical liver biopsy. As shown in Fig. 1A, immunohistochemistry using anti- $\beta$ -galactosidase antibodies revealed hepatocytes with positively-stained nuclei. In contrast, at day 28 no more positive hepatocytes were detected (Fig. 1B). To document whether the disappearance of  $\beta$ -galactosidase expression was due to shut-off of the viral promoter or to loss of the transduced hepatocytes, we performed semi-quantitative PCR to determine the presence of the transgene in

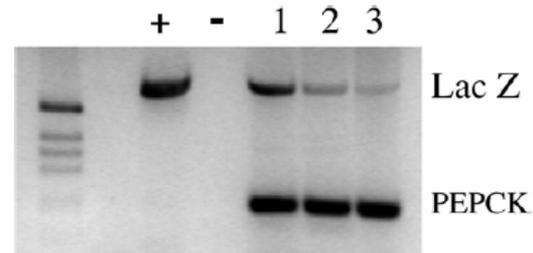
high-molecular-weight DNA prepared from liver biopsies obtained at days 7, 21, and 30.

As shown in Fig. 2, PCR signals declined with time over 4 weeks after virus delivery. This demonstrated that transduced hepatocytes were rapidly eliminated after in-vivo gene delivery and that disappearance of  $\beta$ -galactosidase expression was not due to decreased activity of the gene promoter. Histologic analysis of liver sections revealed hepatic inflammatory lesions that were readily observed at day 14 and accompanied by hepatocyte mitoses (Fig. 3). The inflammatory cells, predominantly lymphocytic, were associated with numerous apoptotic bodies distributed throughout the section. An obvious decrease was observed at day 21, with only a few focal cell deaths associated with mild lobular inflammatory-cells infiltrates.

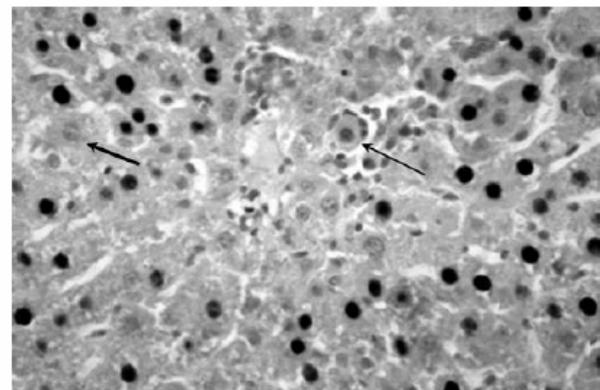
In order to decrease the number of viral particles disseminated in the blood stream, we performed asanguineous perfusion of the regenerating liver with three dilutions of TA7 viral supernatant ( $5 \times 10^6$ ,  $10^7$ , and  $5 \times 10^7$  cfu/ml) in three groups of rats (group 1,  $n = 3$ ; group 2,  $n = 3$ ; group 3,  $n = 5$ ). As shown in Table 1,



**Fig. 1A, B** Immunohistochemical detection of  $\beta$ -galactosidase in paraffin sections after injection of recombinant retroviral vectors. A Positively-stained nuclei visible throughout liver lobule at day 7, but B absent at day 30. (Hematoxylin counterstain,  $\times 240$ )



**Fig. 2** PCR analysis of liver DNA after nls lacZ gene transfer. Lane +: positive control; lane -: negative control; lanes 1, 2, and 3: DNA from biopsies performed at day 7, 21, and 30, respectively. Control: amplified 202-bp fragment from rat PEPCK gene promoter



**Fig. 3** Liver section 14 days after injection of  $\beta$ -galactosidase retroviral particles showing inflammatory cells, sometimes surrounding  $\beta$ -galactosidase hepatocytes (thin arrow) as well as hepatocyte mitosis (thick arrow) (Hematoxylin counterstain,  $\times 1,200$ )

**Table 1** Injection titer and viremia in rats after asanguineous perfusion of TA7 supernatant (group 1, n = 3; group 2, n = 3; group 3, n = 5)

Group	Injection titer	Viremia	Fold decrease
1	$5 \cdot 10^6$	$5.33 \pm 3.2 \cdot 10^3$	937
2	$1 \cdot 10^7$	$6.33 \pm 3.5 \cdot 10^4$	158
3	$5 \cdot 10^7$	$5.84 \pm 3.8 \cdot 10^5$	85

viremia after asanguineous perfusion of TA7 was lower than the injected titer in all 11 rats. The livers of all perfused animals displayed positive cells at day 7. However, we observed the disappearance of  $\beta$ -galactosidase-positive cells in 2 animals perfused with undiluted TA7 supernatant ( $5 \times 10^7$  cfu/ml) and 1 with diluted supernatant ( $5 \times 10^6$  cfu/ml) (Table 2). In contrast, in the other animals  $\beta$ -galactosidase-positive cells were still present more than 41 days after retroviral delivery. It is worth noting that no  $\beta$ -galactosidase antibodies were present in the serum of any animal stably expressing  $\beta$ -galactosidase, whereas the 3 rats showing transient expression developed a humoral response against  $\beta$ -galactosidase (Table 2).

## Discussion

In the present study, the hepatocyte-directed cytotoxic immune response resulting from retroviral-mediated gene transfer to the liver could be avoided by asanguineous perfusion of the liver, which resulted in a mean 600-fold decrease in serum viral titer after perfusion as well as the absence of antibodies directed against the transgene product in most animals. Furthermore, animals that escaped the immune response were able to express the transgene for prolonged periods of time.

Gene therapy for inherited hepatic diseases requires sustained expression of the therapeutic gene in hepatocytes. Many strategies have been devised during the past decade to achieve this goal based on the use of a number of viral and non-viral vectors. Only two vector types

**Table 2** Injection titer, antibodies against  $\beta$ -galactosidase at day 40 (Ab day 40), and  $\beta$ -galactosidase-positive cells (%  $\beta$  Gal) in rats after asanguineous perfusion of TA7 supernatant

Rat no.	Injection titer	Ab day 40	% $\beta$ Gal (at day)
1	$5 \cdot 10^6$	no	0.6 (66)
2	$5 \cdot 10^6$	yes	0 (44)
3	$5 \cdot 10^6$	no	1.1 (55)
4	$1 \cdot 10^7$	no	1.1 (48)
5	$1 \cdot 10^7$	no	0.6 (80)
6	$1 \cdot 10^7$	no	1.7 (66)
7	$5 \cdot 10^7$	no	3.6 (59)
8	$5 \cdot 10^7$	yes	0 (55)
9	$5 \cdot 10^7$	yes	0 (38)
10	$5 \cdot 10^7$	no	16.3 (51)
11	$5 \cdot 10^7$	no	0.6 (41)

have emerged as potentially useful to ensure prolonged expression of a transgene at therapeutic levels: adeno-associated virus (AAV) and RVV. It has been shown in murine models that AAV vectors delivered to the blood stream can transduce hepatocytes and allow sustained expression of the transgene [15, 20]. When applied to large animal models, the same results were obtained but the transgene expression level was lower [21].

AAV vectors are difficult to prepare, and the injected viral load may be crucial to achieve a therapeutic level of expression. Moreover, AAV vectors may induce a humoral as well as a cytotoxic immune response against the transgene product [16, 23]. Although AAV vectors do not directly infect antigen-presenting cells, an immune response may be induced by cross-presentation of the protein to the immune system [19]. Therefore, if immunologic ignorance may be achieved when low levels of expression are reached, high levels of expression could trigger an immune response after antigen cross-presentation.

Regarding RVV, the situation appears similar. When delivered at low doses, they can transduce hepatocytes and allow long-term expression without a significant immune response. When high titers are used, prolonged expression is not always achieved. However, in contrast to AAV vectors, RVV have been shown to be able to infect antigen-presenting cells after i.m. delivery. Therefore, we hypothesized that delivery of vectors to the blood stream can also result in antigen-presenting cell infection, although we cannot exclude that cross-presentation of the transgene product to antigen-presenting cells also occurs. Our present data using asanguineous perfusion of the liver corroborate this hypothesis. Indeed, using this strategy, we observed a decrease in the induction of the immune response that paralleled the decrease in viremia whereas the number of  $\beta$ -galactosidase hepatocytes was maintained. Since cross-presentation is related to the expression level of the protein, if it is implicated in immune-response induction we should have observed a close correlation between transgene expression and immune response independent of the viral load. Since viremia following liver gene transfer is a critical parameter to trigger the immune response, we believe that at least a part of the induction process is mediated via infection of antigen-presenting cells. This is in agreement with previous data showing that induction of the immune response after i.m. RVV injection was dose-dependent.

We believe that gene therapy of inherited diseases is now faced with a critical alternative. Either the viral load and transgene expression are low and do not trigger an immune response, or therapeutic expression levels are reached but potentially result in immune-mediated elimination of corrected cells. Therefore, strategies aimed at circumventing the triggering of an immune response deserve more attention.

**Acknowledgements** This work was supported by grants from the Association Française Contre les Myopathies (AFM).

## References

1. Bralet MP, Branchereau S, Brechot C, Ferry N (1994) Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer – evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 144: 896–905
2. Branchereau S, Calise D, Ferry N (1994) Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 5: 803–808
3. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MKL (1995) High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 69: 7430–7436
4. De Godoy JL, Malafosse R, Fabre M, Mehtali M, Houssin D, Soubrane O (1999) In vivo hepatocyte retrovirus-mediated gene transfer through the rat biliary tract. *Hum Gene Ther* 10: 249–257
5. Ferry N, Heard JM (1998) Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 9: 1975–1981
6. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM (1991) Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8377–8381
7. Grisham JW (1962) A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-3H. *Cancer Res* 22: 842–849
8. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM (1994) Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335–341
9. Grossman M, Rader DJ, Muler DWM, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark III BJ, Stein EA, Lupien PJ, Brewer Jr HB, Raper SE, Wilson JM (1995) A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nature Med* 1: 1148–1154
10. Higgins GM, Anderson RM (1931) Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12: 186–202
11. Irwin MJ, Laube LS, Lee V, Austin M, Chada S, Anderson CG, Townsend K, Jolly DJ, Warner JF (1994) Direct injection of a recombinant retroviral vector induces human immunodeficiency virus-specific immune responses in mice and nonhuman primates. *J Virol* 68: 5036–5044
12. Izembart A, Aguado E, Gauthier O, Aubert D, Moullier P, Ferry N (1999) In vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response. *Hum Gene Ther* 10: 2917–2925
13. Kaleko M, Garcia JV, Miller AD (1991) Persistent gene expression after retroviral gene transfer into liver cells in vivo. *Hum Gene Ther* 2: 27–32
14. Kitten O, Cosset FL, Ferry N (1997) Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 8: 1491–1494
15. Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, Russell DW, Miller AD (1997) Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1426–1431
16. Manning WC, Paliard X, Zhou S, Pat Bland M, Lee AY, Hong K, Walker CM, Escobedo JA, Dwarki V (1997) Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol* 71: 7960–7962
17. Miller AD, Rosman GJ (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7: 980–990
18. Mulligan RC (1993) The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926–932
19. Sarukhan A, Soudais C, Danos O, Jooss K (2001) Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gene Med* 3: 260–270
20. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winther B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, Kay MA (1997) Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16: 270–276
21. Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA (1999) Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 5: 64–70
22. Townsend K, Sallberg M, O'Dea J, Banks T, Driver D, Sauter S, Chang SM, Jolly DJ, Mento SJ, Milich DR, Lee WT (1997) Characterization of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses after genetic immunization with retrovirus vectors expressing different forms of the hepatitis B virus core and e antigens. *J Virol* 71: 3365–3374
23. Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiya K, Mizukami H, Hamajima K, Nomiya H, Saito T, Imai M, Monahan J, Okuda K, Ozawa K, Okuda K (2001) A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 12: 1047–1061
24. Yang Y, Ertl HC, Wilson JM (1994) MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1: 433–442

Ce travail a confirmé en premier lieu que lors d'une injection de 2 ml de surnageant rétroviral à haut titre ( $10^8$  cfu/ml) par une veine périphérique, l'expression du transgène disparaissait en un mois du fait de l'apparition d'une réaction immunitaire cytotoxique. Les coupes histologiques à J 14 montraient une réaction inflammatoire avec une infiltration lymphocytaire et des corps apoptotiques. La disparition des hépatocytes transduits était confirmée par l'histologie à J 30 qui ne montrait plus de cellules positives à la beta-galactosidase et l'analyse de l'ADN recombinant par PCR qui montrait une disparition du transgène. Cette réaction immunitaire cytotoxique était concomitante à l'apparition d'anticorps circulants anti-béta-galactosidase.

Dans le second groupe où 20 ml de surnageant rétroviral étaient perfusés sur un foie isolé de la circulation systémique (figure 12 page 66), une mesure de la virémie résiduelle quelques minutes après la fin de la procédure de perfusion a révélé la présence de vecteur dans la circulation systémique malgré la technique de clampage et le rinçage du foie par du sérum physiologique avant déclampage. Cette virémie était d'autant plus forte que la charge virale du surnageant était importante.

Huit animaux des 11 de ce groupe n'ont pas présenté de réaction immunitaire, avec une expression du transgène à long terme et une absence de sécrétion d'anticorps anti-beta-galactosidase. Parmi les trois rats chez qui l'expression du transgène a disparu avec apparition concomitante d'anticorps, deux appartenaient au sous-groupe des surnageants non dilués.

*Cette étude montrait donc que la technique de perfusion du vecteur sur un foie isolé de la circulation systémique permettait d'éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire contre le produit du*

*transgène pour la plupart des animaux, en utilisant une protéine immunogène et une charge virale dix fois plus importante que dans l'injection périphérique. Néanmoins, les animaux le plus « tolérants » étaient ceux pour lequel l'expression du transgène était inférieure à des taux potentiellement thérapeutiques, et certains des animaux qui exprimaient ces taux thérapeutiques déclenchaient une réaction immunitaire malgré la technique du foie isolé-perfusé. b. Etude de la réaction immunitaire et foie isolé-perfusé*

Les résultats de la première étude nous montraient que la technique du foie isolé-perfusé était une approche potentiellement efficace pour éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire cytotoxique contre le produit du transgène, lors d'un transfert de gène dans le foie par un vecteur rétroviral.

Les deux mécanismes probables déclenchant la réaction immunitaire lors du transfert de gène sont l'infection des cellules présentatrices d'antigène d'une part et une « cross-présentation » de l'antigène soluble présent dans le surnageant viral d'autre part. La technique du foie isolé perfusé a permis dans la première étude de diminuer la virémie systémique, et donc l'infection des cellules APC qui ne sont pas dans le foie. Néanmoins une réaction immunitaire s'est déclenchée chez 2 animaux parmi les 5 du groupe de rat recevant un surnageant non dilué.

L'idée du second travail est d'associer la diminution de la virémie systémique permise par la technique du foie isolé-perfusé à la diminution de la quantité de protéine codé par le transgène et présente dans le surnageant rétroviral. Nous avons employé une technique de purification en passant le surnageant rétroviral dans une colonne d'affinité capable de diminuer le taux de beta-galactosidase soluble, avant d'injecter le surnageant aux animaux. Par ce procédé, nous espérions donc obtenir une diminution du phénomène de « cross-présentation ». Le protocole chirurgical était identique au travail précédent, mais avec un surnageant rétroviral non dilué au titre maximum, afin de se mettre dans les meilleures conditions de transfert de gène et pouvoir aboutir à une correction phénotypique si ce protocole était applicable à des sujets porteurs d'une hépatopathie héréditaire.

## Factors influencing immune response after *in vivo* retrovirus-mediated gene transfer to the liver

Guillaume Podevin<sup>1</sup>  
Edson Otta<sup>1</sup>  
Jean Michel Nguyen<sup>2</sup>  
Virginie Pichard<sup>1</sup>  
Dominique Aubert<sup>1</sup>  
Philippe Moullier<sup>1</sup>  
Nicolas Ferry<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Thérapie génique,  
INSERM ERM 0105, CHU Hôtel Dieu,  
Blv. Jean Monet, 44093 Nantes  
cedex 1, France

<sup>2</sup>Laboratoire de statistique et  
d'informatique médicales, faculté de  
médecine, Nantes, France

\*Correspondence to:

Dr Nicolas Ferry, Laboratoire de  
Thérapie génique, INSERM ERM  
0105, CHU Hôtel Dieu, Blv. Jean  
Monet, 44093 Nantes cedex 1,  
France.  
E-mail: nferry@nantes.inserm.fr

### Abstract

**Background** Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo* triggers an immune response directed against transduced hepatocytes. This effect may be due either to spreading of retroviral vectors in the blood stream with subsequent infection of antigen presenting cells (APCs) or to cross-presentation of the transgene product present as a contaminant in the viral stock. In order to decrease immune response, we evaluated the effect of asanguineous perfusion of the liver as well as purification of the viral stock on long-term transduction of hepatocytes using the nls-lacZ marker gene.

**Methods** Animals were divided in four groups. In group 1, the viral supernatant was perfused in the regenerating liver after complete vascular exclusion of the organ. In group 2, using the same strategy, animals received retroviral supernatant that was passed through a  $\beta$ -galactosidase affinity column to reduce  $\beta$ -galactosidase contamination. In two control groups (respectively groups 3 and 4) the corresponding viral supernatants were delivered via peripheral injection.

**Results** In group 1, 23.1% of animals had no immune response 2 months after gene delivery vs. 33.4% in group 2, 4.3% in control group 3, and 0% in control group 4. Statistical analysis of the results demonstrated that only the difference between groups 2 and 3 was statistically significant. This indicated that both asanguineous perfusion together with passage through an affinity column were required to decrease significantly immune response.

**Conclusions** Our present results suggest that both supernatant contamination and viral spreading contribute to immune response after retrovirus-mediated gene delivery to the liver. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords** liver; gene therapy; retroviral vector; immune response; cross-presentation

### Introduction

Gene therapy for liver inherited diseases should ideally result in indefinite synthesis of a therapeutic protein. Many strategies have been devised during the past years to attain this goal, but were faced with two major difficulties. The first one was to reach a high level of transgene expression in order to reverse a disease phenotype. The second one was to achieve long-term expression of the transgene without induction of an immune response directed against the transgene product. We have focused our interest on *in vivo* gene transfer to the liver using recombinant retroviral vectors. These retroviral vectors

Received: 16 May 2003

Revised: 21 July 2003

Accepted: 24 July 2003

are delivered to the portal blood stream during liver regeneration induced by two-thirds partial hepatectomy [1]. Using this strategy, we previously showed that the level of transduction correlated to the extent of liver regeneration as well as to the viral titer [2,3]. However, it turned out that using high-titer retroviral vectors, the level of liver transduction was high but resulted in short-term expression of the transgene [4,5]. We recently reported that this transient expression was due to the generation of a cytotoxic immune response directed against the transgene product that resulted in elimination of transduced hepatocytes [6].

Although the mechanism whereby retroviral vectors trigger the immune response is still not completely understood, it has been reported that this type of vector could infect antigen presenting cells (APCs) after intramuscular delivery [7,8]. However, other mechanisms such as cross-presentation of the therapeutic protein to the immune system may also occur. Indeed, such cross-presentation was described for adeno-associated virus (AAV)-based vectors which do not infect directly APCs [9,10]. Therefore, the presence of the transgene-encoded protein in the viral preparations may be responsible for induction of immune response via cross-presentation [11].

In the present study we evaluated two strategies aimed at reducing immune response following retrovirus-mediated liver gene delivery using the *E. coli*  $\beta$ -galactosidase protein coupled to a nuclear localisation signal as a reporter. We first reasoned that complete vascular exclusion of the liver at the time of virus delivery could reduce spreading of viral vectors throughout the blood stream and hence could decrease infection of cells outside the liver including extra-hepatic APCs. Secondly, to decrease cross-presentation of the transgene product, viral supernatant was passed through an affinity column to eliminate  $\beta$ -galactosidase contamination. We show that the combination of the two strategies was required to achieve sustained  $\beta$ -galactosidase expression in the absence of immune response in a statistically significant number of animals.

## Materials and methods

### Animals and surgical procedures

Male rats from the congenic Wistar Furth strain and weighing 180–200 g were purchased from Iffa Credo (L'asbresle, France). Animals were maintained under a 12-h light cycle and fed *ad libitum*. All surgical procedures were conducted on deeply anaesthetised animals according to the guidelines of the French Ministère de l'Agriculture. Rats were anaesthetised with isofluran inhalation (3% v/v in air).

Two-thirds partial hepatectomy was performed by removing the two main liver lobes after ligation at the hilum according to the procedure of Higgins and Anderson [12]. Retroviral delivery was performed 24 h after partial

hepatectomy. Asanguineous perfusion of the regenerating liver after complete vascular exclusion was carried out as previously described [1]. Rats were laparotomised and the liver was excluded from the systemic blood stream by clamping the portal vein and the supra-hepatic and infra-hepatic vena cava. The gastroduodenal vein was ligated and sectioned. The portal vein was cannulated and 20 ml of viral supernatant were infused over 5 min. The viral supernatant was harvested from the infra-hepatic vena cava. The liver was rinsed with 6 ml of saline and the blood circulation was restored after suturing the vessels. A blood sample was drawn minutes after declamping and the virus titer of the serum was assayed by end-point dilution using Te671 cells and counting the number of positive colonies after X-Gal staining as described [1]. Peripheral delivery was carried out by direct injection via a peripheral vein of 2 ml of retrovirus-containing medium.

Seven days after retroviral injection, liver biopsies were performed. Rats were anaesthetised and laparotomised to expose the remnant liver lobes. A liver fragment (approx. 10 mg) was obtained from one lobe. Each liver biopsy sample was paraffin-embedded after fixation in formalin.

### Retroviral vectors

The TELCeB6 AF7 cell line (referred to as TA7) produced recombinant retroviral vectors carrying a nls-lacZ reporter gene encoding *E. coli*  $\beta$ -galactosidase coupled to a nuclear localisation signal (nls) [13]. The reporter gene transcription was under the control of the retroviral long terminal repeat (LTR).

A 24 h recombinant retroviral supernatant was harvested from the confluent producer cell line and filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane. Before use, 8  $\mu$ g/ml of polybrene (hexamethedrine bromide (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added to the supernatant.

Titers were determined by end-point dilution using Te671 cells and the number of blue colonies after X-Gal staining were counted. The titer was routinely  $5 \times 10^7$  colony-forming unit (cfu)/ml.

### Affinity column

In order to reduce  $\beta$ -galactosidase present in the viral supernatant, the retroviral supernatant was passed through a HiTrap affinity column (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA) coupled with a rabbit anti- $\beta$ -galactosidase polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA) using a peristaltic pump with a flow rate of 0.4 ml/min. After each use the column was regenerated by rinsing with 1 ml of sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4). The same column was used throughout the study.

The  $\beta$ -galactosidase activity was determined by enzymatic fluorimetric assay using 4 MUG (methylumbelliferyl  $\beta$ -D-galactoside) as a fluorescent substrate. Supernatant was incubated with 0.1mg/ml of 4 MUD (25 mM Tris

HCl, pH 7.5, 125 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM 2-mercaptoethanol, 4 MUG, water) for 30 min at 37°C. Reaction was stopped by 50 ml freezed 25% trichloroacetic acid and the fluorescence was read at 460 µm.

### Immunohistochemistry

The presence of  $\beta$ -galactosidase in hepatocytes was assessed by immunohistochemistry on formalin-fixed/paraffin-embedded sections (5 µm). Sections were deparaffinised and endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in a 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in phosphate-buffered saline (PBS). Polyclonal primary anti- $\beta$ -galactosidase antibody diluted 1:2000 in PBS was applied overnight at 4°C. Positive cells were visualised with biotinylated anti-mouse immunoglobulin and streptavidin/peroxidase using AEC as a chromogenic substrate. Slides were counterstained with hematoxylin and the percentage of positive cells was calculated on different fields at  $\times 40$  magnification.

### Antibody detection

The presence of antibodies directed against  $\beta$ -galactosidase was carried out in rat serum by an ELISA assay. In brief, 96-well dishes were coated overnight at 4°C with commercially available  $\beta$ -galactosidase (Sigma) at 10 mg/ml. After rinsing with PBS/Tween (0.5%, v/v) serial dilutions of the serum were incubated for 1.5 h at 37°C. After washing with PBS/Tween, the presence of antibodies was revealed using biotinylated anti-rat IgG immunoglobulin and streptavidin/peroxidase.

### Statistical methodology

Mann-Whitney's test was used to compare quantitative data between groups. Fischer's exact test was used for categorical data. An analysis of covariance was used to compare the percentage of purification, adjusted on the rank of pass through the column.

### Results

A first group of animals (group 1,  $n = 13$ ) was subjected to partial hepatectomy according to the procedure devised

by Higgins and Anderson [12] and received the next day retroviral vectors containing the nls lacZ gene [13] via asanguineous perfusion of the regenerating liver. Perfusion of the liver after complete vascular exclusion was carried out as previously described [1]. The liver was excluded from the systemic blood flow by clamping the portal vein, the hepatic artery and the supra-hepatic and infra-hepatic vena cava. The portal vein was cannulated and 10 ml of viral supernatant (infectious titer:  $5 \times 10^7$  particles/ml) were infused over 5 min. During the perfusion, the viral supernatant was harvested from the infra-hepatic vena cava. The liver was rinsed with 6 ml of saline and the blood circulation was restored after suturing the vessels. A second group of animals (group 2,  $n = 18$ ) received via asanguineous perfusion the same amount of retroviral supernatant that had been passed through an affinity column coupled with a rabbit anti- $\beta$ -galactosidase polyclonal antibody to remove contaminating  $\beta$ -galactosidase. Control animals received via bolus injection in a peripheral vein 2 ml of either basic viral vector preparation (group 3,  $n = 22$ ) or viral supernatant passed through the affinity column (group 4,  $n = 3$ ). In each group, the transduction of hepatocytes was assessed randomly in some animals in a small surgical biopsy harvested by laparotomy performed at day 7. In these biopsies, the number of  $\beta$ -galactosidase-positive hepatocytes was evaluated by immunohistochemistry. As shown in Table 1, the mean number of positive hepatocytes in the biopsies was variable between groups. However, the differences between groups were not statistically significant (ANOVA,  $p = 0.1$ ). We also observed that the positive hepatocytes were less evenly distributed after asanguineous perfusion than after direct injection in the liver lobes. From day 28 after gene delivery, the presence of anti- $\beta$ -galactosidase antibodies was assessed by ELISA in the serum as previously described [6]. Animals that did not mount an antibody response after 60 days were considered tolerant (Table 1). In these animals, the 1:50 serum dilution was negative for the presence of antibodies by ELISA whereas in all non-tolerant animals the 1:5000 serum dilutions were strongly positive. The presence of such antibodies is a *bona fide* indicator of anti- $\beta$ -galactosidase immune response, and in our previous studies the humoral immune response was always associated with cytotoxic elimination of transduced cells [6]. This may be due to the absence of  $\beta$ -galactosidase secretion since, in other situations, such

Table 1. Summarised data of the animal groups

Group	Administration protocol	n	% Positive hepatocytes day 7	% Tolerant rats*	% Positive hepatocytes day 60 in tolerant animals*
1	Perfusion without column	13	5.8 ± 7.1	23.1	8.8 ± 3.2
2	Perfusion with column	18	12 ± 7.1	33.3	7.5 ± 8
3	Injection without column	22	5.8 ± 2.3	4.5	n.d.
4	Injection with column	3	1.7 ± 1	0	n.d.

$n$  = number of experimental animals.

\*Tolerant rats are rats without antibodies (negative result at 1:50 serum dilution) and with  $\beta$ -gal-positive hepatocytes at day 60.

n.d. = not determined.

## Immune Response in Liver Gene Transfer

19

as factor IX gene delivery using AAV vectors, antibody formation against the transgene product was not always associated with a cytotoxic response [10]. Here again, in animals that had anti- $\beta$ -galactosidase antibodies, no  $\beta$ -gal-positive hepatocytes were detected at the time of sacrifice indicating that a cytotoxic immune response had taken place. In contrast, in tolerant animals,  $\beta$ -gal-positive hepatocytes were still present at sacrifice (day 60) with no significant quantitative differences with the values observed at day 7 (Table 1). The results shown in Table 1 also showed that the overall number of tolerant animals was higher after asanguineous perfusion of the liver (group 1, 23.1% tolerant) as compared with direct injection (group 3, 4.5% tolerant). However, careful statistical analysis revealed that the difference between groups 1 and 3 was not significant (Fischer's exact test,  $p = 0.134$ ). Similarly, the difference between group 2 (asanguineous perfusion with affinity column) and the control group 4 was not significant (Fischer's exact test,  $p = 0.526$ ). Conversely, the number of tolerant rats between group 2 (asanguineous perfusion and passage through the affinity column) and group 3 (33.3 vs. 4.5%) was statistically significant (Fischer's exact test,  $p = 0.033$ ) indicating that both vascular exclusion and  $\beta$ -galactosidase elimination were necessary to decrease immune response significantly. Finally, passage through the affinity column alone was not sufficient to impair immune response since the difference between the two control groups 3 and 4 (direct injection without or with affinity column) was not significant (Fischer's exact test,  $p = 1$ ).

To better understand the impact of each parameter, we first analysed the effect of vascular exclusion on the spreading of viral vectors. To this end, in 29 animals that underwent asanguineous liver perfusion and in 5 control rats injected via a peripheral vein, we harvested a serum sample 5 min after declamping (asanguineous perfusion) or after injection (direct injection) and the number of viral particles in the serum was determined by titration on Te671 cells (assuming a total blood volume of 10 ml for the rats). The values were compared with the total number of viral particles delivered to the animals. As shown in Table 2, a significant difference was observed between the two administration modes and vascular

Table 2. Influence of delivery technique on viral dissemination

Mode of administration	Viral input (infectious particles)	Circulating particles <sup>a</sup> (infectious particles)	Fold decrease
Peripheral injection	$10^8$	$5 \times 10^6$	20*
Asanguineous perfusion	$5 \times 10^8$	$2 \times 10^6$	250

<sup>a</sup>Circulating particles were evaluated in blood samples drawn minutes after injection or after declamping for asanguineous perfusion. The circulating particles were calculated by multiplying the viral titer obtained by the blood volume of the animal (10 ml).

\*Values are significantly different,  $p = 0.014$  using the Mann and Whitney test.

exclusion resulted in a higher decrease in systemic viral particles (250-fold) than direct injection (20-fold;  $p = 0.014$ , Mann-Whitney's test). This indicated that asanguineous perfusion actually reduced the spreading of vectors outside the liver. Nevertheless, after vector administration, viremia were quite similar between injected ( $5 \times 10^5$  infectious particles/ml of serum) and perfused animals ( $2 \times 10^5$  infectious particles/ml). This may be due to the fact that a higher input was used for asanguineous perfusion (10 ml of viral vectors, i.e.  $5 \times 10^8$  infectious particles) compared with injected rats (2 ml of viral vectors, i.e.  $10^8$  infectious particles).

We next analysed the effect of eliminating  $\beta$ -galactosidase protein from the viral supernatant by passing it through an affinity column.  $\beta$ -Galactosidase activity was determined in each viral supernatant before and after passage through the affinity column. The viral titer did not change after passage through the column. The purification rate was calculated as the ratio between the enzyme activity before passage over the activity after passage through the column, and the results from group 2 animals are shown in Table 3. Analysis of the results revealed a correlation between the extent of  $\beta$ -galactosidase purification rate and the absence of immune response (Table 3, Figure 1; Mann and Whitney test,  $p = 0.032$ ). However, this difference was no more significant when the rank of passage through the column was not taken into account. In other words, there was a significant effect of the rank of passage through the column ( $p = 0.03$ ) and the number of tolerant rats was higher after injection of the first supernatants passed through the column. This effect was significant for all passages through lower than 8 and not after (threshold effect) indicating that the potency of the column to eliminate  $\beta$ -galactosidase was reduced after the eight

Table 3.  $\beta$ -Galactosidase purification rate and immune response in animals after asanguineous perfusion (group 2)

Rank of passage	Purification rate (fold decrease)	Presence of immune response in recipient animal (at day 60) <sup>a</sup>
1	70	no
2	100	no
3	100	yes
4	-	no
5	65	no
6	120	no
7	81	yes
8	32	yes
9	60	yes
10	35	yes
11	48	yes
12	35	yes
13	64	yes
14	64	yes
15	66	yes
16	50	no
17	50	yes
18	41	yes

<sup>a</sup>The presence of an immune response corresponds to the existence of circulating antibodies together with the absence of transduced hepatocytes in the liver at sacrifice (60 days after gene transfer)

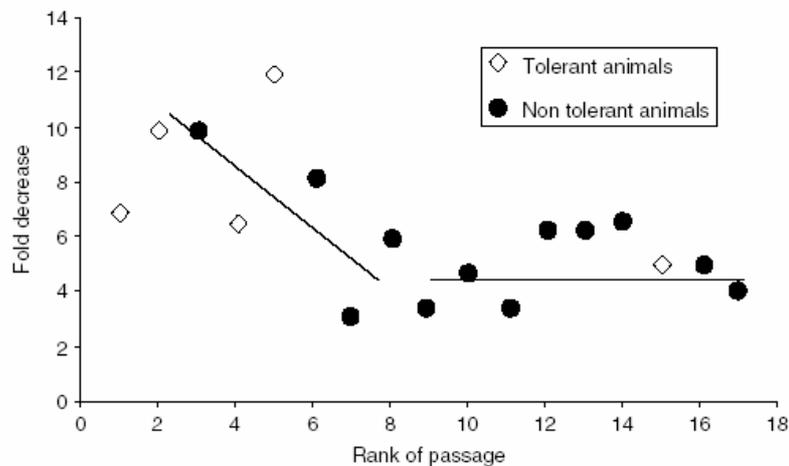


Figure 1. Correlation between the purification rate (fold decrease) and the rank of passage through the column. The rank pass effect was assessed using a comparison of the variance before and after the eighth rank pass through the column. An analysis of covariance was used to compare the percentage of purification, adjusted on the rank of passage through the column. A piecewise linear regression showed a threshold effect after the eighth passage in the column

passage in spite of the procedure used to regenerate the column after each passage. These results were confirmed by the analysis of the homoscedasticity. The variance was significantly different before and after the eighth rank of pass through the column (ratio variance test  $F_{(7,8)}_{ddl} = 5.23$ ;  $p = 0.0329$ ) indicating a threshold effect of the rank of pass. Therefore, a piecewise linear regression was conducted before and after the eighth rank of pass (Figure 1). This variability was not found after the eighth rank pass, demonstrating a differential evolution over rank of pass.

## Discussion

In the present report we show that combination of vascular exclusion of the liver at the time of virus delivery together with elimination of  $\beta$ -galactosidase from the vector preparation lead to decreased immune response and hence to sustained expression of the transgene in the liver. These results support the view that multiple mechanisms are responsible for induction of an immune response against the transgene product after virus-mediated gene delivery. Our data clearly demonstrate a statistical correlation between purification of the viral stock by affinity column and decreased immune response in injected animals. Since the production of retroviral vectors usually involves the harvest of cell culture supernatant, the viral preparations are likely to contain large amounts of the transgene-encoded protein if an ubiquitous promoter is used. In that case, expression of the transgene in the packaging cells results in the presence of the corresponding protein in the cell supernatant which may be cross-presented after being injected. In contrast, when using a tissue-specific promoter, one can avoid expression of the transgene in the viral preparation and hence decrease cross-presentation

after *in vivo* delivery of the viruses. The purification of the viruses by using an affinity column resulted in a dramatic decrease of  $\beta$ -galactosidase contamination. This purification was necessary but not sufficient alone to decrease the immune response, demonstrating that cross-presentation participated in the induction of the immune response, at least to some extent.

Similarly, reduction of virus spreading in the blood flow by using asanguineous liver perfusion was not able to significantly impact immune response, although there was a tendency toward a decreased immune response (23.1% tolerant animals in group 1 vs. 4.3% tolerant animals in group 3). The level of circulating viral particles was higher than we expected after vascular exclusion and extensive wash of the liver before declamping. It seemed likely to us that viral particles loosely attached to hepatocytes during perfusion were released into the systemic blood stream after unclamping even though the liver was rinsed after virus perfusion. Since the circulating level of viral particles is only 2.5-fold lower after asanguineous perfusion than after direct injection, this may explain why the difference in the proportion of tolerant animals between group 1 (23.1%) and group 3 (4.3%) was not statistically significant. It seems likely that a higher diminution in virus spread should become effective and we hypothesise that such specific delivery to the liver using asanguineous perfusion may help to prevent infection of extra-hepatic APCs by decreasing the number of infectious circulating particles. Although this is not formally demonstrated here, it has been shown previously that retrovirus vectors can infect APCs to trigger an immune response [14]. Furthermore, after vascular delivery, it has been demonstrated that retroviruses could infect cells in the spleen and bone marrow [15]. Therefore, combination of vascular exclusion together with supernatant purification could result in decreased APC infection and lower  $\beta$ -galactosidase cross-presentation with ensuing lower induction of immune response.

Such induction of immune response via two different mechanisms is reminiscent of the situation with other vectors such as AAVs. Indeed, previous studies reported that cross-presentation was primarily responsible for the induction of immune response after AAV-mediated gene delivery to the muscle [10,16]. However, it was subsequently shown that infection of APCs such as immature dendritic cells by AAV vector with a ubiquitous promoter could activate cytotoxic T lymphocytes and eliminate transduced muscle cells [17–19]. The site of injection as well as the dose administered could impact on antigen-specific immune response [20,21]. Finally, the use of a tissue-specific promoter could decrease immune response against the transgene product after AAV gene delivery [17,22]. We believe that the same holds true for retroviral vectors and that cross-presentation of the transgene product as well as APC infection are key components of the immune response.

It is now becoming increasingly clear that techniques aimed at avoiding immune response are mandatory for the design of successful *in vivo* gene therapy protocols. Along this line, we now show that improving vector purification and allowing proper delivery to the target organ are helpful to achieve long-term expression in retrovirally transduced liver. The recent demonstration of a complete and stable correction of a genetic disease via retrovirus-mediated gene transfer to the liver in a genetic model resulting from a single point mutation and where no immune response is expected [23] highlights the immune response as an ultimate hurdle before applications of liver gene transfer are successful.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the AFM (Association Française contre les Myopathies) and the Fondation pour la thérapie génique en Pays de Loire.

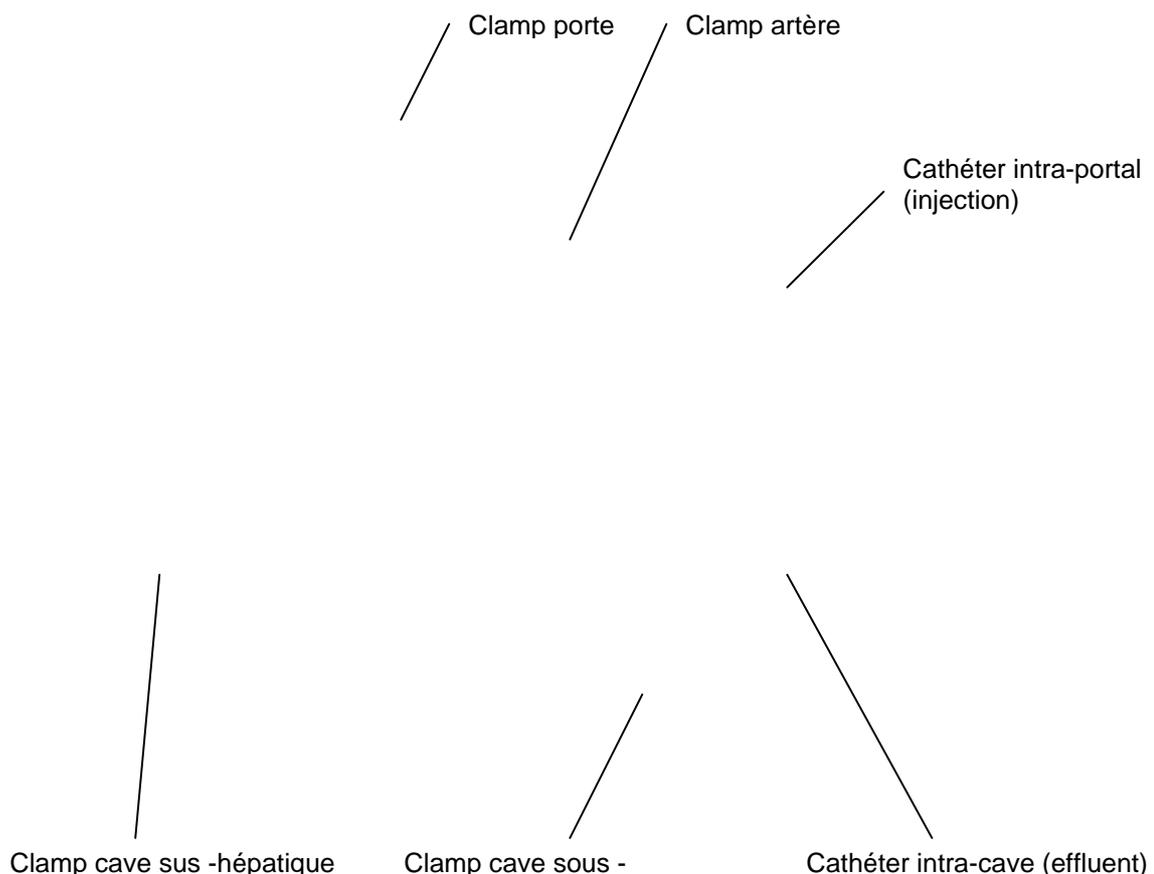
## References

- Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 8377–8381.
- Branchereau S, Calise D, Ferry N. Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 803–808.
- Kitten O, Cosset FL, Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 1491–1494.
- De Godoy JL, Malafosse R, Fabre M, Mehtali M, Houssin D, Soubrane O. *In vivo* hepatocyte retrovirus-mediated gene transfer through the rat biliary tract. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 249–257.
- Izembart A, Aguado E, Gauthier O, Aubert D, Moullier P, Ferry N. *In vivo* retrovirus-mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 2917–2925.
- Aubert D, Menoret S, Chiari E, *et al.* Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat. *Mol Ther* 2002; **5**: 388–396.
- Irwin MJ, Laube LS, Lee V, *et al.* Direct injection of a recombinant retroviral vector induces human immunodeficiency virus-specific immune responses in mice and nonhuman primates. *J Virol* 1994; **68**: 5036–5044.
- Townsend K, Sallberg M, O'Dea J, *et al.* Characterization of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses after genetic immunization with retrovirus vectors expressing different forms of the hepatitis B virus core and e antigens. *J Virol* 1997; **71**: 3365–3674.
- Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 1998; **72**: 4212–4223.
- Fields PA, Kowalczyk DW, Arruda VR, *et al.* Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther* 2000; **1**: 225–235.
- Brown BD, Lillicrap D. Dangerous liaisons: the role of “danger” signals in the immune response to gene therapy. *Blood* 2002; **100**: 1133–1140.
- Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; **12**: 186–202.
- Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MKL. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 1995; **69**: 7430–7436.
- Song ES, Lee V, Surh CD, *et al.* Antigen presentation in retroviral vector-mediated gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 1943–1948.
- McCormack JE, Edwards W, Sensintaffer J, *et al.* Factors affecting long-term expression of a secreted transgene product after intravenous administration of a retroviral vector. *Mol Ther* 2001; **3**: 516–525.
- Sarukhan A, Soudais C, Danos O, Jooss K. Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gene Med* 2001; **3**: 260–270.
- Gordier I, Gao GP, Hack AA, *et al.* Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 205–215.
- Manning WC, Paliard X, Zhou S, *et al.* Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol* 1997; **71**: 7960–7972.
- Zhang Y, Chirmule N, Gao G, Wilson J. CD40 ligand-dependent activation of cytotoxic T lymphocytes by adeno-associated virus vectors *in vivo*: role of immature dendritic cells. *J Virol* 2000; **74**: 8003–8010.
- Herzog RW, Fields PA, Arruda VR, *et al.* Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1281–1291.
- Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H, Zhou JF, Vanin EF, Nienhuis AW. Factors influencing *in vivo* transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 2001; **97**: 1258–1265.
- Yuasa K, Sakamoto M, Miyagoe-Suzuki Y, *et al.* Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther* 2002; **9**: 1576–1588.
- Ponder KP, Melniczek JR, Xu L, *et al.* Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 13 102–13 107.

Quatre groupes de rats ont été constitués en faisant varier deux paramètres, le mode d'administration d'une part, perfusion sur foie isolé ou injection périphérique, et la purification du surnageant par passage sur la colonne d'affinité d'autre part. Les résultats de cette étude ont montré que seul le groupe de rat chez qui était associé foie isolé-perfusé et purification du surnageant par passage sur la colonne d'affinité avait un taux sans réaction immunitaire de 33,3%, significativement supérieur au groupe d'animaux avec injection veineuse périphérique et sans purification du surnageant (4,5%). Les animaux tolérants avaient à long terme un taux de d'hépatocytes transduits de 7,5% +/- 8%, compatible avec une correction phénotypique.

La tolérance au transgène était de manière intéressante corrélée à l'efficacité de la colonne d'affinité. L'étude statistique a montré qu'il y avait un effet de seuil à partir du 8<sup>e</sup> passage de la colonne, avec une colonne peu efficace pour les passages suivants. Parmi les 7 premiers animaux pour lesquels la colonne était la plus efficace, 5 (71%) n'ont pas présenté de réaction immunitaire. Cela tendait à confirmer la participation du phénomène de « cross-présentation », avec déclenchement d'une réaction immunitaire cytotoxique par la présence de produit du transgène dans le surnageant viral. La comparaison des résultats entre le premier travail et le second ne montre pas de différence concernant les rats appartenant aux groupes « foie isolé-perfusé seul », en sachant que les effectifs de deux groupes comparés sont faibles. Le nombre d'animaux qui n'ont pas présenté de réaction immunitaire n'était pas significativement différent entre le groupe des animaux ayant reçu un surnageant non dilué dans la première étude (3 sur 5 ; 60%) et celui de la seconde étude sans colonne d'affinité (3 sur 13 ; 23 % ; p>0,1).

L'ensemble des résultats de ces deux études suggèrent que la technique de foie isolé-perfusé (figure 12 page suivante) doit être affinée afin notamment de diminuer la virémie résiduelle systémique, qui était de  $2 \cdot 10^5$  particules virales / ml dans la seconde étude. Son rendement devra être amélioré, en diminuant le rapport nombre de particules virales injectées sur nombre d'hépatocytes infectés. Une étude de l'infection par les vecteurs des APC hépatiques (cellules de Küpffer) pourrait être menée ainsi que l'utilisation d'un promoteur spécifique à l'hépatocyte, afin de diminuer encore le nombre d'animaux ayant une réaction immunitaire cytotoxique en limitant la participation du foie à son déclenchement. La technique de foie isolé-perfusé doivent d'autre part être testées sur d'autres vecteurs tels que les AAV ou les lentivirus, pour confirmer la logique ubiquitaire de ce mode d'administration chirurgical.



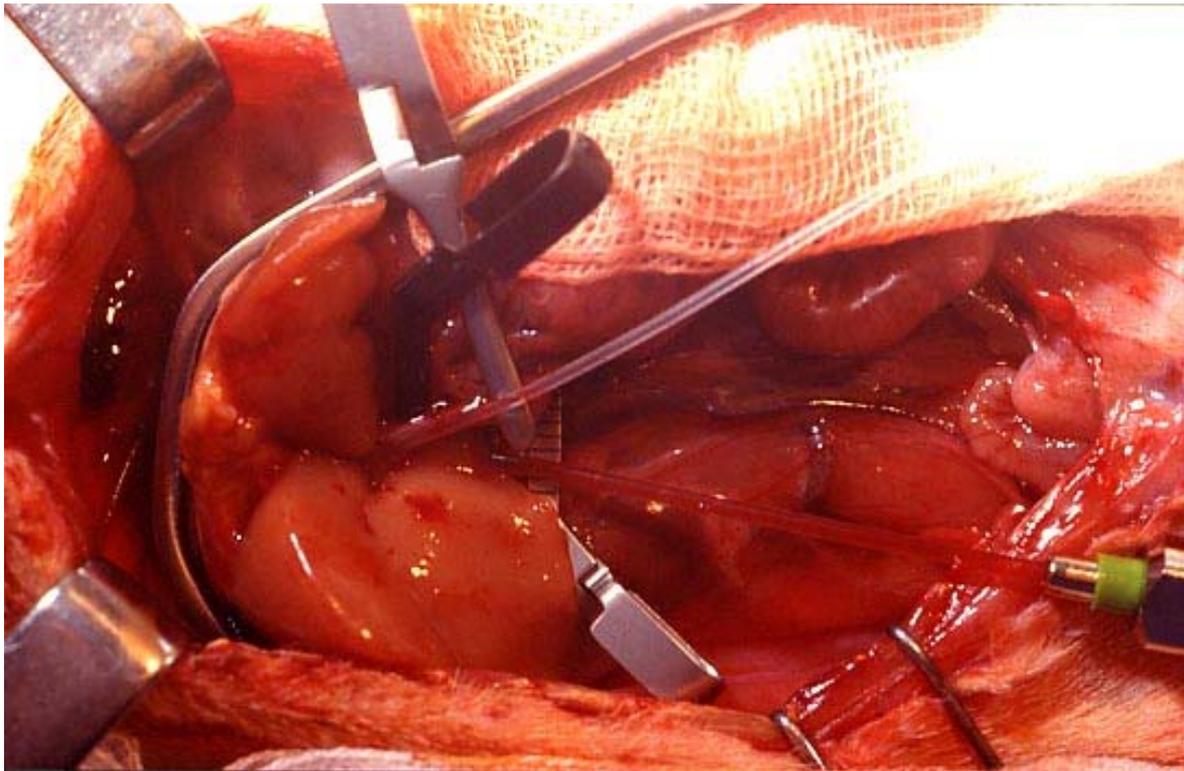


Figure 12 : vue opératoire de la technique de foie isolé-perfusé chez le rat, après hépatectomie de réduction préalable.

### III. APPROCHES CHIRURGICALES DE TRANSFERT DE GÈNE DANS LE FOIE CHEZ LES GROS ANIMAUX

#### *a Transfert de gène par des rétrovirus recombinants dans le foie d'agneau*

Il semblait intéressant d'appliquer chez les gros animaux, dans une étape « pré-clinique », les protocoles chirurgicaux de transfert de gène utilisé chez les rongeurs afin d'y adapter les techniques, de connaître leur tolérance et d'en évaluer l'efficacité. Dans la mesure où au moment de l'étude, les rétrovirus recombinants à haut titre étaient les vecteurs les plus efficaces et pour lesquels une production en masse ne soulevait pas de difficulté technique ou financière particulière, ces vecteurs ont été choisis lors de cette première phase. L'utilisation de ces rétrovirus recombinants impliquait la réalisation d'une hépatectomie partielle de réduction pour provoquer la régénération hépatique indispensable à l'intégration du vecteur, suivi d'une administration intra-portale du surnageant viral.

Ce travail devait répondre à une double question :

Premièrement, la régénération hépatique chez le grand animal était-elle suffisamment intense pour permettre l'intégration de rétrovirus recombinants, avec un protocole chirurgical qui devait rester bien toléré par l'animal.

Deuxièmement, compte tenu de la cinétique de cette régénération hépatique, quelles étaient les conditions optimales concernant la technique d'administration du vecteur.

Nous avons cherché un modèle animal dont les caractéristiques anatomiques correspondraient le plus à l'homme, à un coût financier raisonnable. L'intervention d'hépatectomie partielle est assez complexe et source de morbidité par saignement ou fuite biliaire chez l'homme, et il fallait donc trouver un animal dont l'anatomie hépatique correspondait le mieux à l'anatomie humaine afin que cette évaluation pré-clinique ait un sens. Parmi les animaux ayant une taille comparable à la taille humaine, le chien a été éliminé du fait de la présence d'un foie avec des lobes séparés, rendant

l'hépatectomie partielle beaucoup plus facile que chez l'homme [212]. Le porc n'a pas non plus été choisi parce que des essais avaient déjà montré qu'il ne pouvait pas être infecté par les rétrovirus recombinants. Avant l'utilisation de primates, nous avons donc choisi les agneaux pour cette première étape, dont la correspondance anatomique et histologique avec un foie d'enfant semblait intéressante.



Figure 13: Agneaux dans leur box après hépatectomie de réduction et perfusion portale selon la technique *in flow*.

## In Vivo Retrovirus-Mediated Gene Transfer into Lamb Liver

G. Podevin<sup>1</sup>, J. Podevin<sup>1</sup>, N. Ongoiba<sup>1</sup>, C. Sandoval<sup>2</sup>, M. P. Bralet<sup>3</sup>, N. Ferry<sup>4</sup>, G. Levard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU de Poitiers, France

<sup>2</sup>Département d'Anesthésie, CHU de Poitiers, France

<sup>3</sup>Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Beaujon, Paris, France

<sup>4</sup>Laboratoire de Thérapie Génique, CHU de Nantes, France

### Summary

**Topic:** Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo* has been previously reported in the rat. Before considering human applications of these techniques in the treatment of inherited liver diseases, it was necessary to document its efficiency in a large animal model. Lamb was chosen because the liver was similar to human liver regarding size and anatomy.

**Materials and Methods:** To induce hepatocyte division which is necessary for infection with retroviral particles, animals were subjected to a left hepatectomy. Kinetics of liver regeneration were assessed on sequential liver biopsies after partial hepatectomy in order to provide an evaluation of the peak of maximal liver regeneration in a first animal group. Recombinant retroviruses encoding a reporter gene (*E. coli*  $\beta$  galactosidase) were then perfused through the portal vein of the regenerating liver in a second animal group.

**Results:** The more intense liver regeneration occurred from one to 6 days after partial hepatectomy, with the highest thymidine kinase rate and MIB-1 antibody staining on the second day. The proportion of genetically modified lamb hepatocytes expressing the reporter gene was less than 1%, despite the use of higher titers of retroviral particles than those described in previous reports.

**Conclusion:** The results obtained in rodent livers with this *in vivo* gene transfer methodology cannot currently be scaled up in a large ruminant model. The efficacy of vectors has to be tested in other large mammals before planning gene therapy trials for the treatment of inherited liver diseases.

■ Key words: Gene therapy – Inherited liver diseases – Lamb liver regeneration

### Résumé

**Introduction:** Des transferts de gènes de grande efficacité par des rétrovirus recombinants dans les hépatocytes *in vivo* ont été précédemment rapportés chez le rat. Avant d'envisager une application humaine de ces techniques dans le traitement

des hépatopathies héréditaires, il était nécessaire de documenter leur efficacité dans un modèle de grand animal. L'agneau a été choisi parce que son foie était comparable à celui de l'homme par sa taille et son anatomie.

**Matériel et Méthodes:** Afin de provoquer une division hépatocytaire nécessaire à l'infection par des particules rétrovirales, les animaux ont subi une hépatectomie gauche. La cinétique de la régénération hépatique a été évaluée sur des biopsies hépatiques séquentielles après hépatectomie partielle afin de déterminer le pic de régénération hépatique chez un premier groupe d'animaux. Des rétrovirus recombinants codant pour un gène marqueur ( $\beta$  galactosidase d'*E. coli*) ont ensuite été perfusés par la veine porte du foie en régénération chez un second groupe d'animaux.

**Résultats:** La régénération hépatique la plus intense est survenue entre le premier et le sixième jour après l'hépatectomie partielle, avec un pic du taux de thymidine kinase et de facteur MIB-1 au second jour. La proportion d'hépatocytes d'agneau génétiquement modifiés exprimant le gène marqueur est restée inférieure à 1%, en dépit de l'utilisation de titres de particules rétrovirales plus élevés que dans les précédentes publications.

**Conclusion:** Les résultats obtenus par cette méthodologie de transfert de gène *in vivo* chez les rongeurs ne peuvent pas actuellement être reproduits chez un modèle de grand ruminant. L'efficacité des vecteurs doit être testée chez d'autres grands mammifères avant de prévoir des essais cliniques de thérapie génique dans le traitement des hépatopathies héréditaires.

■ Mots clés: Thérapie génique – Hépatopathies héréditaires – Régénération hépatique de l'agneau

### Resumen

Ha sido previamente demostrado que la transferencia de genes mediada por retrovirus a los hepatocitos de la rata *in vivo* es muy eficaz. Antes de considerar posibles aplicaciones humanas de estas técnicas en el tratamiento de enfermedades hereditarias del hígado es necesario documentar su eficacia en modelos

animales mayores. Elegimos el cordero porque el hígado es similar al humano en lo que se refiere al tamaño y anatomía.

**Material y Metodos:** Para inducir la división de los hepatocitos que es necesaria para la infección con partículas retrovirales los animales fueron sometidos a hepatectomía izquierda. La cinética de la regeneración hepática se evaluó en biopsias hepáticas secuenciales tras la hepatectomía para disponer de información sobre el pico de máxima regeneración hepática en un primer grupo de animales. Se perfundieron retrovirus recombinantes codificantes de un gen transmisor (E. Coli B-galactosidasa) a través de la vena porta del hígado regenerante en el segundo grupo de animales.

**Resultados:** La regeneración hepática más intensa tuvo lugar entre el primero y sexto días tras la hepatectomía parcial con una tasa máxima de timidinkinasa y tinción de anticuerpos MIB-1 en el segundo día. La proporción de hepatocitos de cordero genéticamente modificados que expresaban el gen transmisor fue menor del 1% a pesar del uso de títulos más altos de partículas retrovirales que los descritos en trabajos previos.

**Conclusion:** Los resultados obtenidos en hígados de roedor con esta metodología de transferencia *in vivo* de genes no puede ser reproducida adecuadamente en un modelo mayor de rumiante. La eficacia de los vectores tiene que ser probada en otros mamíferos mayores antes de planear terapias génicas para el tratamiento de enfermedades hepáticas hereditarias.

■ Palabras clave: Tratamiento génico – Hepatopatías hereditarias – Regeneración hepática en el cordero

### Zusammenfassung

**Topic:** Über einen hochwirksamen, durch Retroviren vermittelten Gentransfer in Hepatozyten *in vivo* wurde bei der Ratte bereits früher berichtet. Bevor jedoch diese Technik bei erblichen Lebererkrankungen beim Menschen angewandt werden kann, muss ihre Wirksamkeit bei einem größeren Tier erprobt werden. Da die Leber des Lammes im Hinblick auf Größe und Anatomie der Menschenleber ähnelt, wurde dieses Tiermodell gewählt.

**Material und Methode:** Um Hepatozyten zur Infektion mit retroviralen Partikeln zu gewinnen, wurde bei den Tieren eine linksseitige Hemihepatektomie durchgeführt. Die Kinetik der Leberregeneration wurde durch sequenzielle Leberbiopsien nach der partiellen Hepatektomie untersucht, und das Maximum der Leberregeneration in einer ersten Tiergruppe bestimmt. In einer zweiten Gruppe von Tieren wurden dann die rekombinierten Retroviren mit einem kodierten Marker-Gen (E. coli  $\beta$ -Galactosidase) in die Vena portae der regenerierenden Leber perfundiert.

**Ergebnisse:** Die intensivste Leberregeneration erfolgte zwischen dem 1. und 6. Tag nach Teilhepatektomie mit der höchsten Thymidin-kinase-Rate und MIB-1-Antikörperfärbung am 2. postoperativen Tag. Der Anteil der genetisch modifizierten Lammhepatozyten mit dem Marker-Gen war kleiner als 1% trotz der Verwendung von höheren Titern retroviraler Partikel als in früheren Arbeiten berichtet.

**Schlussfolgerung:** Die bei der Ratte beobachteten Ergebnisse mit dieser Gentransfermethode *in vivo* können nicht auf die Wiederkäuer übertragen werden. Die Wirksamkeit des Verfahrens muss in einem anderen Säugetiermodell erprobt werden, bevor man diese Gentechnik bei erblichen Lebererkrankungen beim Menschen anwenden kann.

■ Schlüsselwörter: Gentechnik – Angeborene Lebererkrankungen – Leberregeneration – Lamm

### Introduction

Gene replacement therapy directed at the liver is a promising approach for the treatment of severe inborn errors of the metabolism in which some require liver transplantation. Many diseases in which the genetic defect results in the absence of synthesis of a normal protein could benefit from such a gene therapy (i.e.  $\alpha$ -1-antitrypsin deficiency, Crigler Najjar disease, hemophilia B) (11). This gene therapy requires permanent expression of the therapeutic gene. Such a long-term expression can be achieved with recombinant retroviral vectors (3). Because hepatocyte division is a prerequisite for efficient retrovirus-mediated gene transfer to the liver, an *in vivo* approach has been proposed which combined a partial hepatectomy aimed at inducing the hepatocyte division, followed by a portal perfusion of the regenerating liver with a retroviral vector preparation. This *in vivo* procedure and the use of high-titer retroviral preparation has allowed transduction of more than 50% of the hepatocytes in the rat (8).

In the present paper, we describe studies made in lambs using the same recent strategy. Our present purpose was to evaluate efficiency and safety of retroviral-mediated *in vivo* liver gene transfer in a larger mammal.

### Materials and Methods

#### Animals

Twenty-four "pré-alpes" male lambs aged  $4.7 \pm 1.0$  weeks, weighing  $12.7 \pm 4.34$  kg, were used in this study. The lambs were kept in the animal holding unit of the experimental surgery laboratory of the Nouzilly INRA center (Indre et Loire, France). All the surgical procedures were conducted in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture.

#### Operative technique

Surgery was carried out between 9.00 and 12.00 a.m. on 12-hours-fasted animals. Anesthesia was induced by inhalation of halothane (2%) and oxygen. Electrocardiogram and transcutaneous oxymetry monitorings were set up. Tracheal intubation was performed for mechanical ventilation. General anesthesia was maintained with 1% halothane in 50% nitrous oxide-50% oxygen, and injections of narcotic (Rapifen®, alfentanil, 30  $\mu$ g/kg) and myorelaxant (Tracurium®, atracurium, 2 mg/kg). Dextrose (5%) was given as intravenous fluid at a rate of 5 ml/kg per hour and supplemented with a 0.9% saline solution to compensate for the blood loss (3 vol/vol). Arterial blood pressure was monitored through a 20-gauge catheter (Seldinger catheter, Vygon, Ecouen, France) inserted in the left foreleg artery and connected to a pressure transducer.

The lambs were restrained in left lateral recumbency. The abdomen was entered via a right subcostal incision. The falciform and left triangular ligaments of the liver were divided. The left extrahepatic hilar structures (hepatic artery, bile duct, portal vein) were dissected separately and ligated. The parenchyma was dissected with a Kelly forceps. The left hepatic vein was

dissected, ligated and oversewn with a vascular suture. The section was completed and the left liver removed. Hemostasis and bilistasis was achieved with clips and fibrin glue.

A single-lumen 9.6-Fr. catheter (Hickman catheter, Bard®, Salt Lake City, USA) was inserted in a right colic vein with its end placed into the portal vein. The other end of the catheter was tunneled subcutaneously before exiting from the back of the animal. The abdomen was closed in layers and anesthesia reversed.

Postoperatively, the animals were allowed fluid *ad libitum*. Prophylactic antibiotherapy was administered by daily intramuscular injections during 7 postoperative days (Intramyline®, benzyl penicillin 60000 UI/kg + dihydrostreptomycin 60 mg/kg).

#### Detection of thymidine kinase activity

Thymidine kinase activity has already been used as a marker of liver cell proliferation in large mammals (6). Thymidine kinase activity was assessed on liver surgical biopsies kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Liver fragments were thawed and weighted. They were immediately homogenized in a final volume corresponding to 5 to 10 times the initial weight in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 1.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM sodium molybdate and glycerol (10% v/v). Protein content of the homogenate was determined by the method of Lowry. Thymidine kinase activity was assayed on 100  $\mu\text{l}$  of homogenate using a radiolabeling kit based on the conversion of 125-I-deoxyuridine (Sangtec biomedical®, Bromma, Sweden).

#### Histological

Cell proliferation in the liver was studied using the MIB-1 monoclonal antibody (immunotech®, Marseille, France) (10). This antibody recognizes a peptide corresponding to a 1002 bp Ki 67 human cDNA fragment. Paraffin sections were dewaxed and incubated for 40 min. with the primary antibody (MIB-1, 1/50 dilution). This was revealed using a peroxidase-coupled rabbit anti-mouse secondary antibody. A peroxidase-coupled pig anti-rabbit antibody was also used to amplify the signal. Finally peroxidase activity was revealed using diaminobenzidine as a substrate.

#### Virus preparation

We used amphotropic recombinant retroviral vectors containing the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) gene coupled to a SV40 nuclear localization signal. The TELCeB6 AF7  $\beta$ -Gal retrovirus-producing cell line is derived from the Te671 cell line and has already been described (2). Cells were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum, 100 mg/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Once the cells reached confluency, the medium was harvested every day and filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  filter. After addition of Polybrene (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), the medium was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

Retroviral titer was determined by infection of NIH-3T3 cells in six-well dishes with 1 ml of serial dilutions of the retrovirus-containing supernatant. The cells were stained 48 hrs later with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-

Gal) and the titer was defined as the number of  $\beta$ -Gal-positive foci multiplied by the dilution factor. In our hands, the best titer observed reached  $5 \times 10^6$  ffu/ml. The absence of helper virus was checked by a BAG mobilization assay as previously described (3).

#### Histochemical detection of $\beta$ -Gal

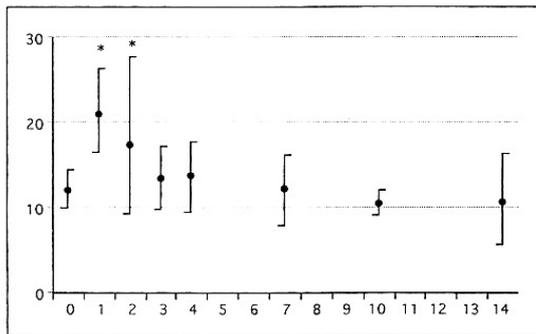
At day 30 post-hepatectomy, the livers were washed *in situ* by perfusion through the portal vein with phosphate-buffered saline (PBS). The livers were removed and at least two 5-mm-thick blocks were sampled in 3 different segments, in order to eliminate potential preferential transduction in particular liver segments. The tissue blocks were fixed by immersion for 20 min in a paraformaldehyde solution (4% wt/vol in PBS). After rinsing in PBS, blocks were immersed overnight in a 30% saccharose solution in PBS, snap-frozen in dry ice-cold isopentane, and cryosectioned (10  $\mu\text{m}$ ).  $\beta$ -Gal activity was assessed on cryostat sections by incubation for 12 hrs at  $32^{\circ}\text{C}$  in PBS (pH = 8.0) containing 0.4 mg/ml X-Gal, 4 mM potassium ferricyanide, 4 mM potassium ferrocyanide, and 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Sections were thereafter counterstained with hematoxylin and eosin.

#### Study design

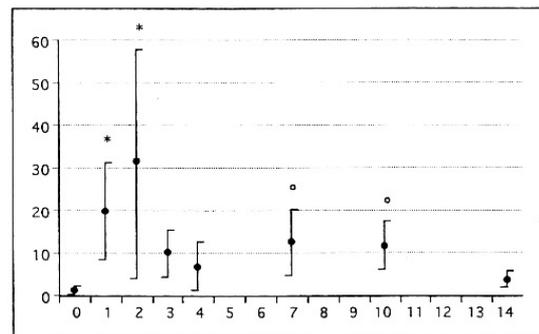
In a preliminary study, several techniques of partial hepatectomy were tried. These assays revealed that clamping the hilus during the partial hepatectomy for more than a few minutes in lambs resulted in a dramatic decrease in the cardiac output and induced brain ischemia and myocardial infarction. Also hepatectomy of the right lobe appeared uneasy because of the difficult approach of the right portal vein of the lamb liver. Consequently, a left hepatectomy without hilus occlusion was then performed as described above with a removal of 40–45% of the liver. Four animals of the end of this training phase were included in the study as a sham operation group.

**Experiment 1:** In a first experiment (two study groups, 4 lambs each allocated by simple randomization), lamb liver regeneration after left hepatectomy was evaluated. Open-wedge liver biopsies were sampled under general anesthesia via the same previous laparotomy. Each liver biopsy was divided into two parts: one was frozen immediately in liquid nitrogen for measurement of thymidine kinase activity, and the other one was fixed in formaldehyde for histological examination. The control for thymidine kinase activity in normal liver was performed on samples from the resected liver lobe. Animals from the first group were sampled on the first, 3rd, and 7th postoperative day (PD), and animals from the second group on the 2nd, 4th, and 10th PD. The two groups were homogenous for age and weight, and the aim of this randomization was to avoid more than 3 surgical liver biopsies for each lamb. Animals were sacrificed at day 14 and their livers were recovered.

**Experiment 2:** In a second experiment (two study groups, 6 lambs each allocated by simple randomization), perfusions by recombinant retrovirus of the regenerating liver were performed. Five hundred milliliters of retroviral preparation were infused through the portal catheter each day at 11 a.m. during half an hour. According to the results of the first experiment, perfusions were carried out from the first to the 3rd PD in the first group, and from the 4th to the 6th PD in the second group.



**Fig. 1** Thymidine kinase activity measured in the lamb liver at daily intervals after 40% partial hepatectomy. Mean values ( $\pm$  SEM) are expressed in dpm/mg protein. \*:  $p < 0.01$  (t-test).



**Fig. 2** MIB-1 labeling detected in the lamb liver at daily intervals after 40% partial hepatectomy. Mean values ( $\pm$  SEM) are expressed in number of positive cells/field ( $\times 40$ ). \*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.02$  (t-test).

The four animals of the sham-operated group received saline solution. The lambs were sacrificed on the 30th PD.

#### Statistical analysis

Student t-test was used for statistical analysis, and a  $p$  value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

### Results

#### General operative details

The operative technique proved to be reproducible in young lambs. The mean blood loss was  $200 \pm 160$  ml. Five cases of wound sepsis were noted in the first experiment (62.5%) due to iterative laparotomies and despite the use of prophylactic antibiotherapy. One death occurred on the seventh PD in the second experiment, because of a portal occlusion probably due to the portal catheter.

#### Experiment 1: lamb liver regeneration

Thymidine kinase activity and MIB-1 staining (Figs. 1 and 2) increased significantly and reached a peak on the first to the second PD ( $p < 0.01$  compared with 0-day value). Then the levels of thymidine kinase activity decreased to the normal value (Fig. 1). The MIB-1 staining rate increased again slightly on the seventh to the tenth PD ( $p < 0.02$  compared with 0-day value) (Fig. 2).

#### Experiment 2: recombinant retrovirus perfusion

The ratio between the  $\beta$ -Gal-positive cells to the total number of hepatocytes in each biopsy never exceeded 1%, with no difference between the first group (1st to 3rd PD) and the second group (4th to 6th PD).

### Discussion

Liver-directed gene therapy for inherited metabolic disorders requires the development of efficient vectors able to deliver a therapeutic gene which has to be expressed for prolonged periods of time. To achieve this goal, various viral and non-vi-

ral gene delivery systems have been developed during the last decade. However, until recently, only retroviral vectors have demonstrated their capability for sustained expression of a therapeutic transgene in animal models. During the last months, adeno-associated virus vector and lentiviral vector have also been shown to allow prolonged expression of a transgene in the liver (5,9), but the difficulty to prepare large stocks of these vectors precludes their use in large animal models now. One limitation to the use of retroviral vectors is their absolute requirement for cell division to achieve correct integration of the transgene in the host cell genome. Such a cell division in the liver can be induced in laboratory rodents by chemical or surgical techniques. Partial hepatectomy has become the most efficient means to induce hepatocyte regeneration and hence achieve highest transduction *in vivo* with recombinant retroviral vectors. Therefore, potential clinical application of this technique in human patients deserves further consideration. One particular point to consider is the peculiar liver regeneration kinetics observed in rodents. Indeed, after a two-third hepatectomy, restoration of a normal liver mass in rats takes only a week and as much as 33% of hepatocytes enter the cell cycle at day 1 after hepatectomy. Liver regeneration in larger mammals is less intense and the peak of cell proliferation is much weaker in dogs and pigs (4,6). It is therefore crucial for clinical application to investigate the usefulness of retrovirus-mediated gene transfer to the liver in larger mammals. Liver-directed gene transfer has already been tested in dogs with only partial success (1). We choose to work with lamb since the anatomy of this animal is close to the human one and the surgical technique of hepatectomy should be comparable in both species.

We report on a very low transgene expression in regenerating lamb liver after retrovirus-mediated gene transfer. This contrasts with previous results from Cardoso et al which demonstrated the feasibility of retroviral gene transfer in regenerating dog liver, although with a large variability among experimental animals (1). Two considerations may be taken in account to explain our results:

First, our analysis of liver regeneration showed that regeneration is a slow process in lambs. Thymidine kinase activities are low as compared to other species and similarly MIB-1 labeling

demonstrated that few cells entered the cell cycle after hepatectomy. This slow regeneration process may also be related to the volume of liver that has been removed during surgery. Indeed, it has been demonstrated in pigs that a large (more than 40%) hepatectomy is required to induce significant hepatocyte regeneration (7). In the present study, the volume of liver removed averaged 40% which may not be sufficient to induce strong regenerative stimuli.

Secondly, hepatocytes in lamb liver may not be easily accessible to viral vectors. Normal liver architecture contains fenestrated endothelium that allow viruses present in the blood stream to reach hepatocytes. However, this is only possible if the basal lamina in the space of Disse is permeable to large macromolecular or viral structures, the size of which may reach 100 nm. The thickness of this basal lamina is variable between species. For example, in pig liver this basal lamina is substantial and this may explain that retroviral vectors are not able to transduce regenerating hepatocytes in these species (N. Ferry, unpublished data). It is known that basal lamina is thicker in ruminants than in other mammals, although it is less important than in pigs. Such a physical barrier may prevent viral vectors to reach hepatocytes and then decrease gene transfer efficiency. However, since human liver displays large fenestrations as well as a thin basal membrane, this problem should not preclude clinical application of liver gene therapy (12).

Finally, the present study demonstrates that liver-directed gene transfer techniques that have proven their efficiency in rodents are not easily scaled up in larger mammals. Further studies are clearly needed before this approach is applicable to patients. Since each species will have its own specificity in terms of regeneration kinetics or liver histology, it seems to us that non-human primates are the only relevant model to clearly define the potential of liver gene therapy using retroviral vectors in clinics.

#### Acknowledgments

We are grateful for their help to Philippe Chemineau, Francis Paulmier, and Gilles Gomot at the Institut National de Recherche Agronomique, Nouzilly, France, and to Véronique Quilien at the Centre Eugène Marquis, Rennes, France.

This work was supported by grants from the Association Française contre la Myopathie and the Fondation pour la Recherche Médicale.

#### References

- Cardoso JE, Branchereau S, Jeyaraj PR, Houssin D, Danos O, Heard JM. *In situ* retrovirus-mediated gene transfer into dog liver. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 411–418
- Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MKL. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 1995; 69: 7430–7436
- Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8377–8381
- Francavilla A, Porter K, Benichou J, Jones J, Starzl T. Liver regeneration in dogs: morphologic and chemical changes. *J Surg Res* 1978; 25: 409–419
- Kafri T, Blvmer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into the liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genet* 1997; 17: 314–317
- Kahn D, Stadler J, Terblanche J, Van Hoorn-Hickman R. Thymidine kinase: an inexpensive index of liver regeneration in a large animal model. *Gastroenterology* 1980; 79: 907–911
- Kahn D, Van Hoorn-Hickman R, Terblanche J, Von Sommoggy ST. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs – the response to different resection sizes. *J Surg Res* 1988; 45: 176–180
- Kitten O, Cosset FL, Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1491–1494
- Koerberl DD, Alexander IE, Halbert CL, Russell DW, Miller AD. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1426–1431
- Mochen C, Giardini R, Costa A, Silvestrini R. MIB-1 and S-phase cell fraction predict survival in non-Hodgkin's lymphomas. *Cell Prolif* 1997; 30: 37–47
- Panis Y, Cardoso J, Houssin D. La thérapie génique en hépatologie – résultats expérimentaux et perspectives cliniques. *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18: 262–276
- Scoazec JY, Flejou JF, D'Errico A et al. Focal nodular hyperplasia of the liver: Composition of the extracellular matrix and expression of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. *Hum Pathol* 1995; 26: 1114–1125

Pr. G. Levard

Service de Chirurgie Pédiatrique  
CHU La Milétrie – Hôpital Jean Bernard  
86021 Poitiers Cédex  
France

E-mail: g.levard@chu-poitiers.fr

Sur le plan anatomique, il a été confirmé que le foie de l'agneau est chirurgicalement proche de celui de l'enfant. La répartition des volumes entre lobe gauche et lobe droit est de l'ordre de 40% versus 60%, chez l'agneau comme chez le petit enfant. Dans la mesure où les hépatectomies droites étaient plus risquée du fait de la nécessité d'une dissection de la veine cave retro-hépatique et chez les agneaux d'une branche porte droite très courte et intra-parenchymateuse rendant sa dissection difficile, il a été décidé de réaliser des lobectomies gauches, cliniquement mieux tolérées.

Néanmoins, comparé aux résections de 70% chez les rongeurs, le signal de régénération après une résection de 40% devait être en conséquence plus faible. Cela a été confirmé par l'étude de la cinétique après hépatectomie de la thymidine kinase et des anticorps MIB-1, deux marqueurs de régénération hépatique qui ont montré un signal plus faible et une cinétique plus lente que chez le rat, avec une ascension des 2 marqueurs au 2<sup>e</sup> jour post-opératoire.

Du fait de ces résultats, il a été décidé d'implanter un cathéter dans le système veineux porte des animaux, afin de réaliser plusieurs injections de vecteurs rétroviraux pendant la phase de régénération, selon une méthode « in-flow » qui avait déjà été appliquée chez le rongeur [213]. Ce cathéter était inséré dans une veine colique, afin de limiter le risque de thrombose porte qui est néanmoins survenue chez un animal, et il était tunnélisé pour limiter les complications septiques ou les déplacements. Ce système a permis une bonne tolérance des animaux aux perfusions rétrovirales itératives (figure 13 p 68).

Malgré le déclenchement d'une régénération hépatique plus lente et moins intense, on pouvait s'attendre à un taux plus faible mais néanmoins significatif d'intégration rétrovirale. Cela n'a pas été observé, et nous avons émis l'hypothèse de la présence d'un endothélium hépatique non fenestré chez ces herbivores qui, contrairement à celui de l'homme, ne laisserait pas passer les particules virales.

Une seconde hypothèse pouvait être émise, impliquant une réaction immunitaire cytotoxique détruisant les hépatocytes transduits. Cette hypothèse n'avait pas été envisagée à l'époque du travail. Elle n'est pas recevable a posteriori. En effet, des biopsies avaient été réalisées à J3 et J7 après la perfusion contenant le rétrovirus recombinant codant pour la beta-galactosidase. La révélation par le X-Gal n'a pas montré de taux de transfert de gène supérieur à 1‰. Or, dans nos expériences chez le rat utilisant le même vecteur et le même gène marqueur, la réaction immunitaire cytotoxique apparaissait à J14 après l'administration, pour culminer à J21, les hépatocytes transduits ayant disparus à J30. Les biopsies à J7 chez ces rats montraient un taux de transfert important. Il est peu vraisemblable que la cinétique de la réaction immunitaire cytotoxique soit beaucoup plus rapide chez l'agneau, en l'absence probable d'une immunité ancienne contre la beta-galactosidase d'*Echerichia Coli*.

En conclusion de cette étude, les résultats très satisfaisants de transfert de gène chez le rat par des rétrovirus recombinants, avec l'obtention de taux de transfert pouvant atteindre 50 % des hépatocytes *in vivo* [167], ne sont pas applicables chez l'agneau ni probablement chez l'homme, car la cinétique de régénération est plus faible et plus lente après une hépatectomie « raisonnable ». La résection hépatique est en effet un geste chirurgical grevé d'une morbidité non négligeable, et il paraît licite de n'envisager que des procédures sans hépatectomie, c'est à dire utilisant des vecteurs ne nécessitant pas de régénération hépatique. De plus, pour des raisons histologiques et anatomiques, les primates non humains sont les seuls modèles de gros animaux qui paraissent pertinents pour développer des études pré-cliniques de transfert de gène dans le foie par des vecteurs viraux.

## *b. Etude préliminaire pour le transfert de gène dans le foie de macaques*

### *Introduction*

Les travaux précédents nous ont appris que l'application clinique humaine du transfert *in vivo* de gène dans le foie devait se faire en utilisant un vecteur ne nécessitant pas d'hépatectomie préalable du fait de la morbidité potentielle de cette dernière. La technique de foie isolé-perfusé permettait d'augmenter la MOI tout en diminuant le risque de réaction immunitaire contre le produit du transgène, dans le but d'obtenir des taux thérapeutiques avec une expression à long terme sans traitement immuno-modulateur. Enfin, les primates devaient être utilisés en priorité dans une phase d'étude pré-clinique, pour leur correspondance anatomique et histologique à l'homme.

C'est pourquoi nous avons entrepris une étude préliminaire afin de déterminer les modalités pratiques et d'évaluer la tolérance clinique de la technique de foie isolé-perfusé chez quatre singes rhésus (*Macaca fascicularis*).

Les buts de cette étude étaient les suivants :

Préciser les particularités de l'anatomie hépatique de ces primates.

Évaluer la tolérance hémodynamique au clampage porte et cave, et la tolérance à l'ischémie du foie.

Définir les modalités de la perfusion hépatique.

Tester une perfusion de surnageant contenant un vecteur AAV.

#### Matériel et méthodes

Animaux

#### Origine des animaux

Les animaux sont des *Macaca fascicularis* mâles, âgés de 3 ans 1/2 à 5 ans, pour un poids moyen de 5 kg. Ces animaux sont tatoués et vermifugés avant leur arrivée. Ils sont ensuite vermifugés tous les 6 mois au Centre de Boisbonne et reçoivent tous les deux mois un antiparasitaire externe.

#### Réception des animaux

A leur arrivée au Centre, les papiers concernant les animaux sont vérifiés (carte de tatouage, sexe, poids, sérologie Herpes B). Un examen clinique individuel est réalisé une semaine plus tard, le temps que les animaux s'acclimatent et récupèrent du stress du voyage.

#### Suivi des animaux

Chaque primate fait l'objet d'un dossier individuel regroupant l'ensemble des pièces le concernant ; permis d'importation et d'exportation, feuilles d'examen, feuilles d'anesthésie, historique et anomalies. Ces dossiers seront archivés par le Centre de Boisbonne à la fin de réalisation du contrat CON001-03.

Hébergement

#### Alimentation

Les animaux sont nourris à l'aide d'un aliment complet adapté aux primates de l'ancien monde. Ils reçoivent chaque jour, en plus de cet aliment industriel, des fruits frais et secs.

Les macaques sont pesés tous les mois afin de pouvoir détecter toute altération de l'état général de l'un d'entre eux et afin de pouvoir réajuster quantitativement la ration. Ils disposent d'eau de boisson à volonté, en pipette.

#### Cages

Les macaques sont hébergés par couple. La pièce d'hébergement est maintenue à une température de 22°C +/- 1°C.

Un programme d'activité a été organisé afin d'enrichir leur environnement : ils disposent de la télévision et de la radio deux fois par jour et des jouets, changés chaque semaine, sont déposés dans leurs cages.

### Chirurgie expérimentale

#### **Première série : Joe et Willy**

#### Anesthésie

##### PREMEDICATION

*Atropine : 50 µg/kg SC, 20 mn avant induction.*

*tiletamine/zolazépam (Zoletil 10 mg/kg IM).*

##### INDUCTION

*Réalisée au masque à l'aide d'isoflurane administré à 5% dans un mélange d'oxygène médical. Anesthésie poursuivie après intubation endotrachéale (Xylocaïne) à l'aide de 1 à 2% d'isoflurane dans un mélange d'oxygène médical.*

##### ABORD VEINEUX

*Pose d'un cathéter veineux périphérique à la veine saphène.*

##### MONITORING

*ECG : scopie pour troubles du rythme et sous-décalages*

*SpO<sub>2</sub> : pouls + saturation de l'hémoglobine en oxygène*

*Thermomètre rectal*

Pression artérielle non invasive**FLUIDES**

Remplissage vasculaire de 1/5 du volume sanguin : environ 50ml de NaCl 0,9% ou de macromolécules (gélofusine).

PREVENTION DE L'HYPOTHERMIE

monitoring de la température

couverture chauffante recouverte de champs opératoires

Mode opératoire chirurgical

**JOE : Evaluation anatomique, clampage hépatique et biopsie.**

Incision sous-costale droite et médiane.

Abord du foie qui est lobulé en 5 lobes, un lobe pour le segment 1 de Couineau, un lobe pour 2 et 3, un lobe pour 4, un lobe pour 5 et 8, un lobe pour 6 et 7, en allant de la gauche vers la droite.

Libération du foie par section du ligament falciforme, et des ligaments triangulaires droit et gauche. Passage retro-cave par libération de bas en haut, sur une veine cave retro-hépatique courte.

Ouverture du petit épiploon, puis passage d'un lac pour clampage hépatique 10 mn, bien supporté sur le plan hémodynamique.

Point en cadre au vicryl 2/0 sur le rebord du lobe antérieur droit, puis biopsie aux ciseaux d'1 cm<sup>3</sup>.

Fermeture au vicryl plan par plan. Surjet intra et sous dermique sur la peau.

**WILLY : 1) cathétérisme jugulaire interne gauche- 2) perfusion de sérum physiologique sur foie isolé**

1) incision horizontale médiane en regard du sterno-cléido-mastoïdien gauche. Passage transmusculaire et abord de la veine jugulaire, assez profonde. Mise en place d'un cathlon bleu centré sur une bourse de prolène 6/0. Fermeture de la bourse. Rapprochement des berges musculaires au vicryl. Points séparés de vicryl sur la peau. Le cathlon sera enlevé en fin d'intervention.

2) Incision sous-costale droite et médiane, avec un trait de refend supérieur médian.

Abord du foie. Libération du foie par section du ligament falciforme, et des ligaments triangulaires droit et gauche.

Libération retro-cave de bas en haut, puis passage d'un lac de silastic large en boucle. Dissection de la veine cave sous hépatique, au-dessus du rein et passage d'un petit lac silastic.

Ouverture du petit épiploon, puis passage d'un lac silastic large autour du pédicule portal. Clampage hépatique et cave de 3 mn, bien supporté sur le plan hémodynamique. Déclampage.

Mise en place d'un cathlon jaune centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine porte. Fermeture de la bourse. Mise en place d'un cathlon bleu centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine cave inférieure sous-hépatique. Fermeture de la bourse. Clampage porte, cave sous-hépatique et cave sus-hépatique. Perfusion de 6 x 15 ml de sérum physiologique par l'intermédiaire d'un prolongateur, récupéré en partie avec du sang en cave inférieure sous-hépatique. Ablation des cathlons, fermeture des orifices par un point de prolène.

Déclampage (durée du clampage : 10 mn).

Fermeture au vicryl plan par plan. Surjet intra et sous dermique au Monocryl.

Réveil et soins postopératoires

REVEIL

Arrêt des gaz anesthésiants.

Assistance respiratoire sous O<sub>2</sub> pur avec perfusion lente de soluté macromoléculaire.

ANTIBIOTHERAPIE

Injection pré et post-opératoire céphalexine 20mg/kg (Rilexine®, 250 mg).

CONTROLE BIOLOGIQUE POST-OPERATOIRE

Willy : Analyse en fin d'intervention NF/iono/bilan hépato-rénal

**Deuxième série : Moïse et Jack**

Anesthésie

PREMEDICATION (20 minutes avant l'intubation trachéale)

Tranquillisation de l'animal : Zolétil = Tilétamine (dissociatif) + zolazepam (benzodiazépine) : 7 mg/kg

Métoclopramide (primpérid® ou primpéran®) : 1 mg/kg SC

Morphine : 0.3 mg/kg SC (durée d'action 4 à 6 h)

Atropine : 50 µg/kg SC

**INDUCTION** de l'anesthésie réalisée au masque à l'aide d'isoflurane administré à 5% dans un mélange d'oxygène médical. Anesthésie poursuivie après intubation endotrachéale à l'aide de 0,8% d'isoflurane dans un mélange d'oxygène médical administré à un débit de 1,2 l/mn.

**ABORD VEINEUX**

Pose d'un cathéter veineux périphérique à la veine saphène.

Pose d'un cathéter veineux central à la veine jugulaire après incision cutanée et isolement de la veine. type : 8 cm de long et ~ 1.2 cm de diamètre interne, technique de Seldinger (mandrin) (Moïse). Catheter rose (Jack).

**MONITORING**

ECG : scopie pour troubles du rythme et sous-décalages

SpO<sub>2</sub> : pouls + saturation de l'hémoglobine en oxygène

EtCO<sub>2</sub> : ventilation + estimation de l'évolution du débit cardiaque

Thermomètre rectal

Pression artérielle non invasive

Mesure de la pression veineuse centrale à l'aide d'une tubulure dite « colonne de pression » fixée sur une règle graduée en centimètres

**DROGUES UTILISEES AU COURS DE L'ANESTHESIE**

Morphiniques : remifentanyl: 0.1 µg/kg/min (Moïse) et 0.3 µg/kg/min (Jack) en continu

Curares: Atracurium (tracrium®) : 0.5 mg/kg renouvelé à raison de 0.25 mg/kg/20min

**FLUIDES**

~15 ml/kg/heure (1 goutte/ 2 secondes) avant la chirurgie

Administration d'environ 400 ml de Ringer lactate® au cours de l'intervention (Moïse) et environ 600 ml (Jack), en fonction de la mesure de la PVC et de la PA.

**PREVENTION DE L'HYPOTHERMIE**

monitoring de la température

couverture de survie

chauffage des solutions de perfusion

**Mode opératoire chirurgical**

**MOÏSE** : 1) cathétérisme jugulaire interne droit. 2) perfusion de sérum physiologique avec bleu de méthylène sur foie isolé (figure 15 p 85)

1) incision horizontale médiane en regard du sterno-cléido-mastoïdien droit. Passage transmusculaire et abord de la veine jugulaire, assez profonde et médiane. Mise en place d'un seldinger 10 cm centré sur une bourse de prolène 6/0. Fermeture de la bourse. Rapprochement des berges musculaires au vicryl. Points séparés de Monocryl intradermique inversant. Le cathéter sera enlevé en fin d'intervention.

2) Incision sous-costale droite et médiane, avec un trait de refend supérieur médian.

Abord du foie. Libération du foie par section du ligament falciforme, et des ligaments triangulaires droit et gauche. Libération retro-cave en haut, puis passage d'un lac de silastic large en boucle. Dissection de la veine cave sous hépatique, en libérant la surrénale droite et passage d'un petit lac silastic. Ouverture du petit épiploon, puis passage d'un lac silastic large autour du pédicule portal. Clampage hépatique et cave 2 mn, bien supporté sur le plan hémodynamique. Déclampage.

Mise en place d'un cathlon bleu centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine porte. Fermeture de la bourse. Mise en place d'un cathlon rose centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine cave inférieure sous-hépatique. Fermeture de la bourse. Clampage hépatique, cave sous-hépatique et cave sus-hépatique.

Perfusion de 2 x 50 ml de sérum physiologique par l'intermédiaire d'un prolongateur, récupéré en partie avec du sang en cave inférieure sous-hépatique avec aspiration, puis de 50 ml de sérum coloré au bleu de méthylène, puis de 40 ml de rinçage. Ablation des cathlons, fermeture des orifices par un point de prolène. Déclampage (durée du clampage : 15 mn).

Fermeture au vicryl plan par plan. Surjet intra et sous dermique au Monocryl.

**JACK**

**Intervention n° 1** : 1) cathétérisme jugulaire interne droit. 2) perfusion sur foie isolé d'AAV5 nls LacZ

1) incision horizontale médiane en regard du sterno-cléido-mastoïdien droit. Passage sur le bord antérieur du SCM et abord de la veine jugulaire droite. Mise en place d'un cathlon rose centré sur une bourse de prolène

5/0. Fermeture de la bourse. Rapprochement des berges musculaires au vicryl. Points séparés de Monocryl intradermique inversant. Le cathlon sera enlevé en fin d'intervention.

2) Incision sous-costale droite et médiane, avec un trait de refend supérieur médian.

Abord du foie. Libération du foie par section du ligament falciforme, et des ligaments triangulaires droit et gauche. Libération retro-cave en haut, puis passage d'un lac de silastic large en boucle. Dissection de la veine cave sous hépatique, en libérant la surrénale droite et passage d'un lac silastic.

Ouverture du petit épiploon. Vérification d'absence d'artère hépatique gauche. Dissection du pédicule porte puis passage d'un lac silastic autour de la veine porte, et d'un lac autour de l'artère. Clampage hépatique et cave 2 mn, moyennement supporté sur le plan hémodynamique. Déclampage. Remplissage vasculaire.

Mise en place d'un cathlon vert centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine porte. Fermeture de la bourse. Mise en place d'un cathlon orange centré sur une bourse de prolène 6/0 dans la veine cave inférieure sous-hépatique. Fermeture de la bourse. Clampage porte et cave sous-hépatique par les lacs, hépatique par un bulldog, et cave sus-hépatique par une kelly. Perfusion de 80 ml de sérum physiologique par l'intermédiaire d'un prolongateur, récupéré en partie avec du sang en cave inférieur sous-hépatique avec aspiration, le sang étant réinjecté en périphérie. Puis perfusion de 30 ml de solution AAV5 LacZ à la dose de  $3,7.10^{10}$  pg/kg, avec recueil de l'effluent toujours mélangé avec un peu de sang malgré la vérification des clamps. Pause permettant une exposition du vecteur de 3 mn dans le foie. Puis rinçage avec 60 ml de sérum physiologique. Ablation des cathlons, fermeture des orifices par un point de prolène. Déclampage (durée du clampage : 15 mn).

Fermeture au vicryl plan par plan. Surjet intra et sous dermique au Monocryl.

#### Intervention n° 2. : biopsies hépatiques (figure 14 p suivante)

Reprise de l'incision sous-costale droite.

Abord du foie après libération de quelques adhérences entre le foie et la paroi. Biopsie hépatique du lobe médian, à trois emplacements différents sur le bord antérieur, après suture hémostatique et bilistatique au vicryl 0, emportant à chaque fois entre 1/2 et 1 cm<sup>3</sup> de parenchyme.

Fermeture au vicryl 4/0 plan par plan. Surjet intra et sous dermique au Monocryl.

#### Réveil et soins postopératoires

##### REVEIL

Arrêt des curares

Arrêt des morphiniques per-opératoires

Arrêt des gaz anesthésiants DOULEUR POST-OPERATOIRE

Morphiniques :

Injection de morphine à 0,2 mg/kg (Moïse) et à 0,3 mg/kg (Jack), 6 heures après la première injection préopératoire.

Injection de buprénorphine à 10 µg/kg deux fois par jour pendant 7 jours (première injection réalisée 4 heures après la dernière injection de morphine)

Anti-inflammatoires non stéroïdiens : Kétoprofène (Ketofen®) 1 mg/kg/j pendant 3 jours.

##### ANTIBIOTHERAPIE

Une injection quotidienne de MARBOCYL 10% à la posologie de 0,02 ml / kg de poids, pendant 10 jours.

##### CONTROLE BIOLOGIQUE POST-OPERATOIRE

Bilan sanguin 3 jours avant la chirurgie puis 1 heure, 48 heures et 5 jours après la chirurgie, comportant : NFS, urée, créatinine, phosphatases alcalines, ALAT, protéines totales, albumine, bilirubine.

#### Tableau récapitulatif des chirurgies effectuées

Tatouage	NOM	Date des opérations	Type d'injection
62843	Joe	25/01/2001	Etude anatomique. Test de clampage
62842	Willy	02/02/2001	Perfusion de sérum physiologique
62927	Moïse	03/02/2003	Perfusion de bleu de méthylène
62875	Jack	10/02/2003	Perfusion d'AAV5 – nls LacZ
62875	Jack	18/03/2003	Biopsies hépatiques



Figure 14 : vue de Jack préopératoire avant sa biopsie hépatique Résultats

#### Prise en charge anesthésique

Le clampage hépatique impose une voie veineuse supra-diaphragmatique pour un remplissage à la demande, au mieux guidé par une pression veineuse centrale. Une fois ces conditions remplies, la tolérance a été bonne chez les quatre animaux, avec une baisse modérée de la tension artérielle et du rythme cardiaque, et une augmentation de la fréquence respiratoire à 30 /min pendant les 5 premières minutes après déclampage. Aucune anomalie notable n'a été détectée à l'ECG ou au niveau de la saturation en O<sub>2</sub>.

La température rectale est descendue dès le début de l'intervention pour les 4 animaux, au plus bas à 33°C pour Willy. La remontée lente en fin d'intervention s'est faite en deux heures environ avec une couverture chauffante.

Il n'y a pas eu de complication post-opératoire à type de douleur ou d'infection pariétale.

#### Expérimentation chirurgicale

##### WILLY

Seul 60 des 90 ml de sérum physiologique ont été récupérés au niveau de la veine cave sous-hépatique, avec une analyse du perfusât montrant du sang dilué à 1/5 du volume. Il n'y a pas eu de décoloration du foie. Il est décidé d'augmenter le volume de perfusion même si le volume sanguin du foie est d'environ 30 ml pour un animal de 5 kg, d'améliorer le clampage tout en restant peu traumatique, et de vérifier l'absence d'apport sanguin au sein du système de clampage, notamment par la glande surrénale droite.

##### MOÏSE

La perfusion a permis une décoloration sanguine puis une coloration au bleu, mais seulement au niveau du lobe médian et du petit lobe caudé. Les 2 lobes droit et gauche ne se sont pas colorés au bleu. Il est décidé de vérifier l'absence d'artère hépatique gauche ou droite, de faire un clampage sus-hépatique plus à distance de la confluence, afin d'éviter de couder les veines sus-hépatiques latérales, et de disséquer et clamer sélectivement les vaisseaux du pédicule hépatique, artère et veine porte. Il faudra aussi améliorer l'évacuation cave par un plus gros cathon.

JACK

La perfusion était bien meilleure que pour Moïse mais elle a surtout été visible au niveau du lobe médian et a été moins évidente dans le petit lobe caudé et les 2 lobes droit et gauche. Le système de clampage devra donc être optimisé.

Tolérance biologique

Elle était bonne sur le plan hépatique, avec une dilution systémique non négligeable per-opératoire chez les 3 animaux où des contrôle biologiques ont été effectués (Joe a été sacrifié en fin d'expérimentation chirurgicale).

Date	Protéines totales g/l	Hb g/dl	<u>WILLY</u>
normes	55-80	11-15	
Pré-op	67	12	
H 1	12	8.6	
J 3	60	10	

MOÏSE

Date	Urée g/l	Créat mg/l	ALAT UI/l	PAL UI/l	Albumine g/l	Bilirubine mg/l	GR 10 <sup>12</sup> /l	GB 10 <sup>9</sup> /l	Hb g/dl	Ht %
normes	0,2-0,6	<12	<80	<200	30-45	<6	4-7	13-33	11-15	40-55
préop	0.4	6	65	1963	41	<5	6.58	17.43	11.4	43.7
H 1	0.3	5	108	1294	27	<5	4.74	21.7	8.1	31.4
J 2	0,37	7,9	132	1349	37	<5	3,8	7,5	6,5	24
J 11	0.4	6	104	1010	32	<5	4.3	8.7	9	36

JACK

Date	Urée g/l	Créat mg/l	ALAT UI/l	PAL UI/l	Albumine g/l	Bilirubine mg/l	GR 10 <sup>12</sup> /l	GB 10 <sup>9</sup> /l	Hb g/dl	Ht %
normes	0,2-0,6	<12	<80	<200	30-45	<6	4-7	13-33	11-15	40-55
préop	0.4	6	29	1395	53	<5	8.2	7.6	13.9	57
H 1	0.3	5	72	1086	15	<5	7.29	13.69	12.1	50
J 2	0.2	7.2	46	1050		<5	5.7	14.2	13	37
J 4	0.3	9	37	956	35	<5	5.9	13.2	11.8	39

Résultats anatomopathologiques. Efficacité du transfert de gène

L'examen en coloration standard de Moïse a montré des dilatations de quelques sinusoides et des lymphatiques des espaces portes. Il y avait une hémossidérose marquée disséminée.

La coloration X-Gal de Jack a montré la positivité de rares hépatocytes, avec un taux de transfert de gène inférieur à 1 %.

### Discussion

*Cette étude préliminaire a permis la réalisation de 4 clampages et 3 perfusions hépatiques chez des singes Macaca fascicularis. Elle a montré la bonne tolérance hémodynamique des animaux, avec la nécessité néanmoins d'une voie d'abord veineuse centrale afin de permettre un remplissage de l'étage sus-diaphragmatique en fonction de la pression veineuse centrale. Les conditions anesthésiques utilisées en clinique humaine ont été appliquées, en obtenant notamment une bonne analgésie post-opératoire. La déglobulisation secondaire au lavage du foie a été modérée, et le bilan hépatique a été peu perturbé par l'ischémie transitoire secondaire au clampage.*

Malgré une meilleure connaissance de l'anatomie du macaque et une amélioration de l'instrumentation et de la technique chirurgicale au cours de ces 4 interventions, il n'a pas été possible d'obtenir une perfusion de l'ensemble du foie, avec des lobes latéraux moins perfusés que les lobes centraux. L'anatomie hépatique du macaque est différente de celle d'un enfant du même poids sur plusieurs points. La lobulation hépatique n'apporte pas de différence notable par rapport à la clinique humaine, puisqu'il n'y a pas eu d'hépatectomie de réduction dans cette expérience. En revanche, s'agissant d'un animal adulte et marchant à quatre pattes, le volume de son foie est donc plus petit que celui d'un nourrisson de 5 kg et il a une position abdominale plus profonde, sous-costale. Cette situation anatomique rend l'abord de la veine cave notamment sus-hépatique plus difficile, ce qui explique peut-être les problèmes initiaux d'étanchéité du clampage hépatique. Mais l'absence de répartition harmonieuse du perfusé dans le foie tient très probablement aux conditions hémodynamiques de la perfusion. La pression et le débit de l'injection intra-portale ont été insuffisants comparés aux résultats obtenus chez les rongeurs, malgré l'augmentation des calibres des cathéters sur les derniers animaux.

Le taux faible de transfert de gène obtenu chez le dernier animal avec la perfusion d'AAV confirme qu'il est nécessaire d'améliorer et de préciser les modalités de la perfusion afin que l'ensemble du foie soit perfusé. L'utilisation de MOI plus importantes et proches des données publiées dans la littérature, entre  $10^{12}$  et  $10^{13}$  particules génomiques/kg de poids soit 100 à 1000 fois la dose reçue par Jack, devrait d'autre part améliorer sensiblement les résultats.

Deux études réalisées chez les macaques en utilisant des AAV ont montré que les AAV de sérotype 7 et 8 étaient plus « hépatophiles », avec des taux de transfert plus importants qu'avec les sérotypes 2 et 5 [186, 193]. Ces sérotypes 7 ou 8 devront donc être choisis préférentiellement, s'il n'existe pas une immunité pré-existante contre eux. Cette éventualité fréquente a été le deuxième enseignement de ces études, la présence d'anticorps « naturels » diminue en effet considérablement l'efficacité de la transduction virale. Elle impose une vérification des sérologies des animaux avant toute injection, afin de détecter des anticorps dirigés contre un ou plusieurs de ces 4 sérotypes, puis de choisir le sérotype contre lequel l'animal n'est pas immunisé.

Un autre travail utilisant des AAV 2 chez les macaques avait d'autre part confirmé que la voie portale était le mode d'injection le plus efficace comparé à la voie artérielle hépatique [82]. Dans ces trois travaux pré-cités, l'étude de la diffusion tissulaire des vecteurs après injection portale a montré la présence du transgène dans la rate et parfois dans les reins. Cette diffusion pourra être évitée par la technique de foie isolé-perfusé, avec les avantages attendus sur le plan immunologique.

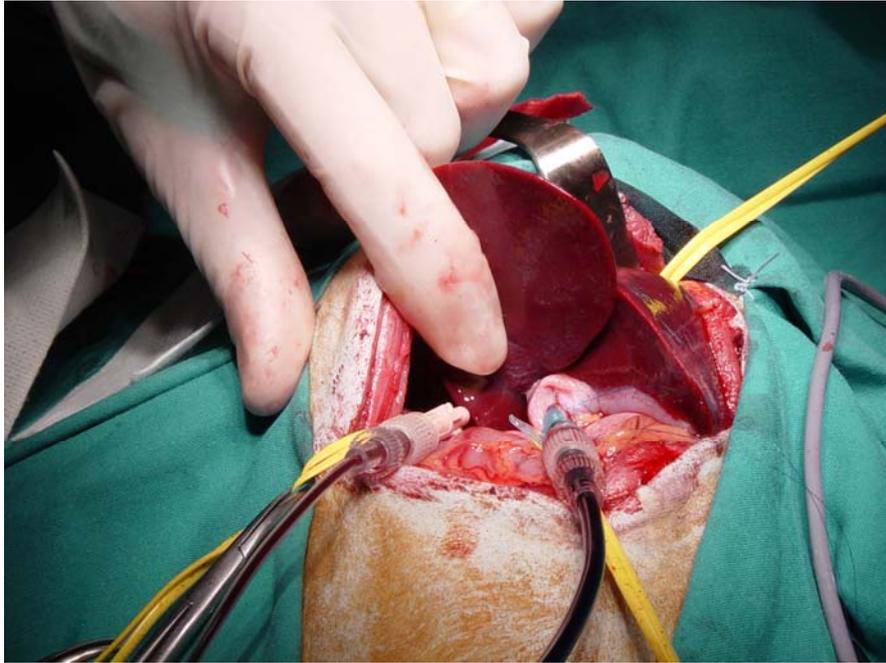


Figure 15 : vue opératoire de la perfusion hépatique de bleu de méthylène chez Moïse

## CONCLUSION PERSPECTIVES

La correction des hépatopathies héréditaires par des techniques de transfert de gène avec des vecteurs viraux dans le foie impose un taux de correction hépatocytaire variable en fonction des déficits mais de l'ordre de 10 à 20 % pour la plupart des hépatopathies récessives, avec une expression à long terme du transgène, c'est à dire sans provoquer de réaction immunitaire contre la protéine thérapeutique menant à la destruction des hépatocytes modifiés génétiquement. Les techniques chirurgicales que nous avons contribué à mettre au point sont bien adaptées à ce cahier des charges dans la perspective d'une application clinique pour plusieurs raisons.

Le premier argument est l'application d'un principe de précaution selon lequel l'approche chirurgicale évite la diffusion du vecteur et de son transgène à l'ensemble de l'organisme receveur, empêchant ainsi un transfert de gène dans d'autres organes telles que les gonades. L'administration d'un vecteur viral porteur d'un gène étranger ne sera acceptée sur le plan éthique que si elle est limitée au maximum à l'organe cible, avec une diffusion minimale aux autres organes. La technique du foie isolé-perfusé permet cette administration ciblée sur un organe siège de nombreuses voies métaboliques et donc de multiples déficits héréditaires potentiellement corrigibles.

Le second argument concerne l'augmentation de la concentration des vecteurs au niveau de l'organe cible. Historiquement, un des premiers objectifs de la technique chirurgicale de foie isolé perfusé avec des rétrovirus recombinants a été d'augmenter la MOI de ces vecteurs dont les titres étaient faibles, afin d'atteindre des taux d'infections de l'ordre de 5% des hépatocytes et une transduction efficace à long terme [166]. La nécessité de provoquer une régénération hépatique nécessaire à l'intégration des rétrovirus imposait la réalisation d'une hépatectomie préalable. Notre travail sur les agneaux a montré que cette approche n'était pas envisageable pour une application clinique, du fait de la morbidité potentielle de l'hépatectomie partielle et des paramètres de régénération hépatique différents entre les rongeurs et les gros animaux [214]. La preuve récente de l'augmentation du risque d'oncogénèse par mutagenèse insertionnelle des rétrovirus est une raison supplémentaire pour les abandonner au profit des autres vecteurs viraux, AAV, lentivirus ou adénovirus « gutless ».

L'argument d'augmentation de la MOI reste pour autant pertinent pour ces trois types de vecteurs dont la production en masse est encore problématique. L'administration au seul organe cible peut permettre de diminuer le volume de surnageant viral nécessaire à l'obtention de taux de transfert de gène thérapeutique.

Le troisième argument est venu de l'utilisation de rétrovirus recombinant à haut titre qui ont mené à la mise en évidence d'une réaction immunitaire cytotoxique, dirigée contre le produit du transgène et provoquant la destruction des hépatocytes modifiés génétiquement [195, 196]. Nous avons montré dans notre travail que la technique de foie isolé-perfusé associée à une purification du surnageant viral permettait de diminuer de manière importante la probabilité d'une réaction immunitaire contre le produit du transgène [215, 216]. Il a d'autre part été montré que l'utilisation d'un promoteur spécifique à l'hépatocyte évitait l'expression du transgène lors de l'infection par le vecteur des APC [85, 205], expression qui est un des mécanismes responsables du déclenchement de la réaction cytotoxique [197, 202, 203]. La technique de foie isolé-perfusé associée à l'utilisation d'un promoteur spécifique doit pouvoir éviter tout traitement immunosuppresseur chez les malades candidats à la thérapie génique et pour lesquels il existe des risques de réponse immunitaire contre la protéine thérapeutique.

Ces résultats nous permettent d'envisager un essai clinique en appliquant la technique de foie isolé-perfusé. La morbidité de cette intervention est bien inférieure à la transplantation hépatique, seul traitement curatif alternatif actuellement disponible pour plusieurs hépatopathies héréditaires. Deux étapes expérimentales chirurgicales sont néanmoins requises avant cette étude clinique. Un nouveau travail sur les rats est nécessaire pour optimiser les paramètres de la perfusion. Une fois ceux-ci définis, ils devront être appliqués aux macaques, afin d'obtenir des taux thérapeutiques de transfert de gène dans le foie. Nous proposons de mener ces trois étapes, les deux travaux pré-cliniques chez

les rongeurs et les primates puis l'essai clinique, selon le protocole suivant : Expérimentation chez le rat

Plusieurs séries d'animaux permettront de tester les différents paramètres de la perfusion : Le volume, le débit, la température, le temps d'exposition du vecteur, la quantité et la qualité du liquide de rinçage. L'objectif est double : (1) obtenir un taux de transfert de gène efficace de l'ensemble du foie, le plus constant possible entre les animaux ; (2) rester économe sur le nombre de particules virales injectées, puisqu'il y a de possibles difficultés de production de gros volume du surnageant viral pour les grands animaux.

Un dernier paramètre, celui de la pression de perfusion, sera exploré particulièrement. Les techniques d'injection sur les membres isolés [146] montrent que la distension capillaire par le surnageant viral peut augmenter considérablement le taux de transfert. Nous pensons de la même manière augmenter la pression d'injection dans le foie, afin de diffuser le surnageant dans l'ensemble des lobes hépatiques. En s'inspirant des techniques d'injections périphériques par bolus, avec reflux du surnageant par les veines sus-hépatiques [141, 142], il est aussi envisager de modifier la technique de foie isolé-perfusé en réalisant une perfusion rétrograde. L'exclusion hépatique par clampage est identique à la technique décrite, mais l'injection se fait par la veine cave inférieure, ce qui permet de baigner le foie par le surnageant en remplissant au maximum les sinusoides hépatiques [217]. La rapidité de l'injection semblant être un autre facteur clef de l'efficacité de la technique pour les membres isolés [146], l'abord pour l'injection de la veine cave qui est de plus gros calibre que la veine porte permet d'utiliser de plus gros cathéters et de faciliter la suture au retrait de celui-ci.

Le vecteur utilisé sera l'AAV dans un premier temps puisque, à notre avis, il s'agit du seul vecteur utilisable actuellement dans les protocoles cliniques pour son excellente tolérance et son expression à long terme dans le foie en l'absence d'immunité ancienne. Pour la définition de la technique de perfusion et de ses paramètres, les rats Wistar et le gène marqueur de la beta-galactosidase seront choisis. La meilleure technique sera ensuite appliquée au rat Gunn sevré, en utilisant le gène de l'UGT1, afin de confirmer sur un modèle d'hépatopathie héréditaire la modification pérenne du phénotype.

#### Expérimentation chez le macaque

La meilleure des techniques de perfusion, rétrograde ou antérograde, avec hyper-pression ou non, et les données rapportées au poids de l'animal seront transposées ensuite du rat au macaque pour une deuxième série d'expérience chez les primates. Nous pensons en effet que les primates pour leur correspondance anatomique et histologique à l'homme sont les seuls modèles applicables dans une phase d'étude pré-clinique. De plus, le protocole expérimental de la phase préliminaire décrite dans notre travail a montré la bonne tolérance des macaques à la technique du foie isolé-perfusé si les conditions anesthésique et chirurgicale sont optimales.

La lobulation hépatique du macaque pourra être utilisée dans une série d'expérience en ne perfusant qu'un seul lobe, ce qui aurait l'avantage sur le plan de la technique chirurgicale de mieux contrôler les paramètres de la perfusion et l'étanchéité du clampage. Sur le plan du transfert de gène, il serait ainsi facile d'augmenter la MOI tout en ne consommant qu'une quantité limitée de vecteur. Sur le plan de la pertinence clinique, l'extrapolation des résultats au foie entier d'un nourrisson ne devrait pas entraîner de biais majeur.

Afin d'éviter le déclenchement de toute réaction immunitaire, plusieurs critères de prévention seront appliqués. Le vecteur choisi dans cette étape pré-clinique pour son efficacité potentielle et sa bonne tolérance clinique sera l'AAV de sérotype 8. Les animaux devront donc être sero-négatif à l'AAV8, afin d'éviter toute réaction immunitaire contre la capsid virale, réaction secondaire à une immunité ancienne. D'autre part, le surnageant viral sera purifié de la protéine produit de transgène afin de limiter une réaction immunitaire par « cross présentation », et un promoteur spécifique à l'hépatocyte sera inclus dans la construction du transgène afin d'éviter une réaction immunitaire secondaire à l'infection des APC. L'isolement du foie par la technique chirurgicale isolé-perfusé sera le dernier mode de prévention de cette réponse immunitaire, en diminuant la diffusion du vecteur aux autres organes lymphoïdes et à la rate. Cette diffusion sera contrôlée histologiquement.

Deux gènes marqueurs pourront être testés chez deux groupes d'animaux. Celui de la beta-galactosidase permettra de renseigner la répartition histologique du transfert de gène. L'utilisation d'un gène codant une protéine sécrétée dans le sang comme l'érythropoïétine pourra d'autre part documenter l'expression du transgène au cours du temps.

### Essai clinique

Dans l'hypothèse où les résultats chez le macaque sont conformes aux prévisions, c'est à dire avec une bonne tolérance de la procédure chirurgicale et du vecteur, et avec une expression à long terme du transgène de plus de 10 %, il nous semble justifié de mettre en place un essai clinique de phase I-II. Des patients atteints de la maladie de Crigler Najjar pourront être enrôlés puisque leur maladie est grave et puisque la transplantation hépatique, seule alternative thérapeutique curative actuelle, est liée à une mortalité et une morbidité conséquente. Le risque immunologique de réaction contre le produit du transgène est d'autre part faible pour les patients français, car la maladie de Crigler Najjar chez ces patients est secondaire à une mutation ponctuelle, avec une UGT1 mutée très peu différente sur le plan immunologique de l'UGT1 humaine normale. Enfin dans cette maladie, le concept d'efficacité de la thérapie génique a été démontré avec succès récemment chez le rat Gunn, modèle de la maladie de Crigler-Najjar avec différents types de vecteurs de transfert de gène [109, 110].

La technique de foie isolé-perfusé développée chez le primate pourra être appliquée chez ces patients, en utilisant des AAV8, vecteurs du gène de l'UGT1 humaine, qui auront été produits selon des normes cliniques. En cas de succès avec une correction du phénotype à long terme sans effet secondaire notable, la thérapie génique du foie selon une méthode chirurgicale *in vivo* sera entrée dans l'arsenal thérapeutique des hépatopathies héréditaires.

## ANNEXES

ANNEXE 1

## In Vivo Retroviral-Mediated Transfer of a Marker-Gene in Ornithine Transcarbamylase-Deficient Spf<sup>ash</sup> Mice

By Guillaume Podevin, Nicolas Ferry, Denis Calise, and Yann Révillon  
Paris, France

● Gene therapy is a new therapeutic approach for inherited metabolic hepatopathies. The authors studied the potential application of such a strategy to the correction of ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency by in vivo protocol of retroviral-mediated gene transfer to the liver. A partial hepatectomy was followed (24 to 48 hours later) by asanguinous perfusion of the regenerating liver with  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) recombinant retrovirus. This protocol allowed  $\beta$ -gal gene transfer in normal C57B6 mice liver with  $60 \pm 52$  positive cells per square centimeter. This proportion never exceeded 20 cells per square centimeter in OTC-deficient *spf<sup>ash</sup>* mice. The high mortality rate for *spf<sup>ash</sup>* mice was explained by an important sensitivity of those mice to the protein catabolism rather than by technical difficulties during intraportal perfusion. This first in vivo retroviral-mediated gene transfer study in animals with a life-threatening metabolic inherited hepatopathy showed that, despite efficiency of gene therapy in normal animal models, several experimental difficulties should be overcome before human application of this protocol is considered.

Copyright © 1996 by W.B. Saunders Company

**INDEX WORDS:** Inherited metabolic hepatopathies, gene therapy.

**H**UMAN ORNITHINE transcarbamylase (OTC) deficiency is one of the most frequent hereditary hyperammonemias. This X-linked inherited disease often leads to death in affected males, and the only curative therapy is liver transplantation.<sup>1</sup>

The mouse with sparse fur with abnormal skin and hair (*spf<sup>ash</sup>*) is a model for OTC deficiency. To find an alternative treatment, several gene transfer systems have been tested using this model.<sup>2,3</sup> Recombinant adenovirus vector has been injected into newborn *spf<sup>ash</sup>* mice liver<sup>4</sup> or transferred in vitro in deficient hepatocytes<sup>5</sup> with an efficient OTC expression. However, recombinant adenoviruses induce a cellular immune response that rapidly leads to destruction of genetically modified hepatocytes.<sup>6</sup>

From the Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Faculté de Necker-Enfants Malades, Paris, France.

Supported in part by the Association Claude Bernard, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Association Française contre les Myopathies (AFM).

G.P. is a recipient of grants from Guigoz® and the Association Claude Bernard.

Address reprint requests to Professor Yann Révillon, Clinique de Chirurgie Pédiatrique, Service de Chirurgie Viscérale, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres, 75743 Paris, Cedex 15, France.

Copyright © 1996 by W.B. Saunders Company  
0022-3468/96/3111-0011\$03.00/0

Our purpose was to develop retroviral-mediated gene transfer in *spf<sup>ash</sup>* mice, because recombinant retroviral vectors ensure genomic integration of few transgene copies in a permanent configuration that is transmitted to the cell progeny. Because the ex vitro infection of cultured liver cells followed by reimplantation is technically complex and poorly efficient, we chose to evaluate in OTC-deficient mice the in vivo approach described previously.<sup>7</sup>

### MATERIALS AND METHODS

#### Retroviral Vectors

The MGF NB vector contains the *LacZ* gene of *Escherichia coli* coupled to a SV40 nuclear localisation sequence (nls) inserted in the pMFG retroviral vector.<sup>7</sup> The transcription of the nls *LacZ* gene is under control of the long terminal repeat (LTR) promoter. Amphotropic recombinant retroviruses were obtained as described, using the amphotropic YCRIP packaging cell line.<sup>7</sup> Titers of the nls *LacZ* vectors were assayed using NIH-3T3 cells, and routinely were of  $5 \times 10^5$  ffu/mL. Supernatants containing retroviral particles used in this study were harvested from confluent-producing cells, filtered through 0.45- $\mu$ m filters, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until use. Just before use, supernatants were concentrated by centrifugation (3,370g during 45 minutes) through 300-kd Macrosep filters (Filtron). Polybrene was added to the final concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the supernatant was perfused as described below.

#### Animals

Male C57BL6 and *spf<sup>ash</sup>* mice (body weight, 25 g) were maintained on 12-hour light/dark cycles and allowed tap water ad libitum. C57BL6 mice received standard chow (UAR). *Spf<sup>ash</sup>* mice were maintained under standard chow but received a hypoprotidic diet (5% w/w) and glucose-supplemented water (5% w/w) for 1 week, starting 3 days before surgery. Ammonemia and orotic aciduria were evaluated daily during the protocol.

All animals were anesthetized by intraperitoneal administration of 2,2,2-tribromoethanol (0.3 mg/g body weight). All surgical procedures were conducted according to the regulations of the French Ministère de l'Agriculture.

#### Partial Hepatectomy—Asanguinous Perfusion of the Liver

Twenty *spf<sup>ash</sup>* male mice were subjected to a two-step surgical procedure, as follows.

A 1-cm midline abdominal incision was made, extending from the xyphoid process. The median and left lateral lobes were ligated sequentially with 4-0 silk suture and surgically removed leaving the gallbladder intact. This left approximately 30% of the liver mass intact.

Twenty-four to 48 hours later, the remaining right lateral and caudal liver lobes were isolated from the blood flow and perfused. First, the proximal portal vein, the proximal gastroduodenal vein,

and the infrahepatic vena cava were dissected. Right suprarenal vessels were coagulated. After ligation of the gastroduodenal vein, the blood supply to the liver was interrupted by clamping the portal vein and the suprahepatic and infrahepatic vena cavae. The retroviral supernatant, prepared as described in the Retroviral Vectors section, was infused at 25°C through a SILASTIC® cannula (Dow Corning, Midland, MI) inserted into the portal vein with a flow rate of 1 mL/min. Perfusion medium was collected from the infrahepatic vena cava. After 5 minutes of perfusion, the vessels were sutured and the hepatic blood flow was reestablished.

The mice demonstrated extreme sensitivity to the clamping of the suprahepatic vena cava, and in most cases mechanical ventilation was necessary. To avoid the high mortality rate associated with prolonged clamping of the portal blood flow, the entire perfusion procedure was carried out in less than 15 minutes.

#### Detection of $\beta$ -Galactosidase Activity

The livers were fixed by in situ perfusion of a 4% paraformaldehyde solution in phosphate-buffered saline (PBS). Liver fragments were either stained directly by overnight incubation at 37°C in X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside) or immersed in a 30% sucrose solution in PBS and snap-frozen in dry ice-cold isopentane. Cryostat sections (10  $\mu$ m thick) were made, were incubated for 6 to 15 hours in X-Gal, and were counterstained with H&E. Positive, blue nuclei were counted in different sections from various lobes of each liver, and the results were expressed as the number of positive cells per square centimeter of the histological section. Hepatocytes represent 65% of the total liver volume.<sup>8</sup> Therefore, approximately 90,000 hepatocytes are present per square centimeter of the histological section. Dividing the number of positive cells per square centimeter by 90,000 results in an estimation of the proportion of positive cells in the whole liver.

### RESULTS

To assess the feasibility of the protocol, a partial hepatectomy followed (24 to 48 hours later) by asanguinous liver perfusion with  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) recombinant retrovirus were performed on C57B6 male mice. This hepatectomy is necessary because retroviral vectors are only able to integrate into actively dividing cells. Moreover, because maximal division of hepatocytes occurs 24 to 48 hours after partial hepatectomy, perfusion was performed at this time.<sup>7</sup> Eighty-nine percent of the animals survived both procedures. They were killed 2 to 3 weeks later, and the number of positive cells was counted. The mean number of positive cells found in mice liver was  $60 \pm 52$  per square centimeter, which agrees with previous results.<sup>9</sup>

Next, the same surgical procedure was performed on OTC-deficient mice. Twenty  $spf^{ash}$  male mice were subjected to a two-thirds liver resection. Four mice died before the perfusion step because of lethal hyperammonemia. The mortality rate for  $spf^{ash}$  mice subjected only to partial hepatectomy, estimated in a previous evaluation, was similar (27.8%). Among the 16 living mice of the protocol, four died during perfusion. Surgical problems were portal hemorrhage

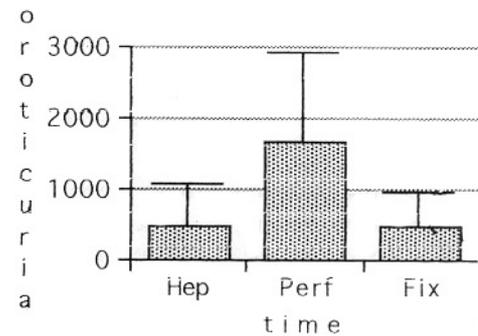


Fig 1. Orotic aciduria during surgical procedures in  $spf^{ash}$  mice. Orotic aciduria values are expressed as  $\mu$ mol of creatinine and represent the mean ( $\pm$ SD) values obtained for 15 animals for hep, 9 for perf, and 3 for fix. Normal =  $50 \pm 8.5$   $\mu$ mol/mmol of creatinine; hep, before hepatectomy; perf, before liver perfusion; fix, before fixation.

as a result of vena tear with the catheter (two cases), portal thrombosis (one case), and ventilation difficulties (the last case). Six other mice died later of metabolic disorders. The overall mortality rate reached 70%; 50% of the deaths were attributable to hepatopathy metabolic disorders. Body weight decrease between hepatectomy and perfusion, from  $24.2 \pm 4.2$  g to  $21.5 \pm 4.2$  g. Furthermore, as shown in Fig 1, orotic aciduria increased significantly between the two surgical procedures, rising to  $1,661 \pm 1,274$   $\mu$ mol/mmol creatinine before perfusion ( $t$  test,  $P = .006$ ).

Despite the fact that the perfusion procedure and titers of the nls *LacZ* vectors were identical for the C57B6 and  $spf^{ash}$  groups, the number of positive cells in the liver of  $spf^{ash}$  surviving mice never exceeded 20 per square centimeter (Fig 2).

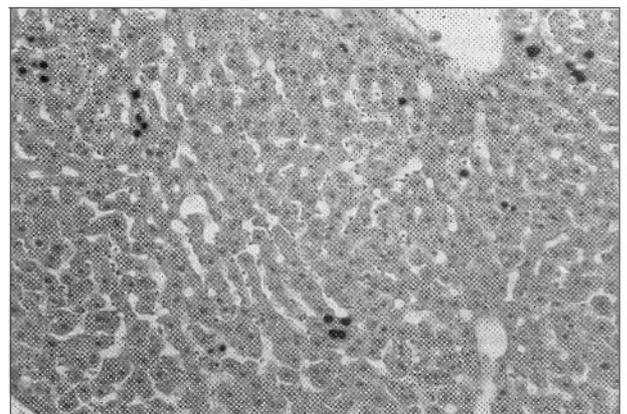


Fig 2. Histochemical detection of  $\beta$ -galactosidase activity in  $spf^{ash}$  mouse liver after perfusion.  $Spf^{ash}$  mice were subjected to partial hepatectomy and asanguinous liver perfusion with recombinant retroviral vectors, as indicated in the Materials and Methods section. Seven days after perfusion, the liver was fixed and cryosections (10  $\mu$ m) were stained with X-Gal and counterstained with H&E. Positive cells show dark nuclei (original magnification  $\times 150$ ).

## DISCUSSION

Among inborn errors of metabolism, OTC deficiency is an attractive candidate for liver gene therapy. OTC production is located mainly in the liver and is not controlled by gene regulation.<sup>10</sup> Several hepatocyte transduction techniques have been explored, such as adenoviral-mediated gene transfer techniques.<sup>5</sup> But an important limitation in the use of adenoviruses for gene therapy has been loss of recombinant gene expression. A virus-specific cellular immune response is stimulated, which leads to destruction of genetically modified hepatocytes.<sup>6</sup> Currently, only the techniques that involve retroviral vectors appear promising because of the stable integration and long-term expression of foreign genes using these vectors, assuming the promoter of the transferred gene is selected correctly and is not subject to down-regulation *in vivo*.<sup>7</sup> In addition, recombinant retroviruses are unable to replicate and do not produce infectious progeny once integration has occurred.<sup>11</sup>

Because cell division is required for genomic integration of retroviruses and because most hepatocytes are quiescent cells in the adult liver, two general approaches have been developed for liver-directed retroviral-mediated gene transfer. The *ex vivo* approach requires primary culture and *in vitro* transduction of the hepatocyte.<sup>12</sup> Despite other results,<sup>13</sup> *in vitro* processing of *spf<sup>ash</sup>* liver cells required the development of special culture medium and made the transduction risky (our unpublished observations). *In vivo* approaches have relied on protocols that involve partial hepatectomy, performed to induce a regenerative phase in the remaining liver, followed by (1) *in situ* injection during in-flow occlusion<sup>14,15</sup> or (2) asanguinous liver perfusion<sup>7</sup> of recombinant retroviruses. The second protocol yielded a lower infection rate<sup>9</sup> and prevented dissemination of viral particles into

the blood stream. This rate of infection is lower in mice than in rats,<sup>9</sup> and this was confirmed by the present study.

Partial hepatectomy did not induce significant morbidity in normal C57B6 mice, and the overall protocol of asanguinous liver perfusion of recombinant retroviruses may be a suitable method for long-term complementation of a genetic defect. The powerful LTR promoter used in the retroviral DNA construction may compensate the low infection rate in mice for an efficient expression of the transgene. Moreover, this promoter is able to drive expression of the gene for prolonged periods in the liver.<sup>7,9</sup> Among *spf<sup>ash</sup>* mice, however, the mortality rate increased to nearly 100% in our first experimentations. Hypoprotidic food, glucose-supplemented water, and the use of short-term anesthetic agents decreased the mortality rate to 50%. The OTC activity of *spf<sup>ash</sup>* male mice never exceed 5% of the normal level,<sup>16</sup> and 70% hepatectomy brought it to about 2%. This very low OTC activity explained the extreme sensitivity of *spf<sup>ash</sup>* mice to the protein catabolism, and therefore the high mortality rate during the second surgical procedure. This life-threatening situation could explain the lower liver-cells regeneration rate and consequently the lower retroviral infection rate in *spf<sup>ash</sup>* mice.

This work represents the first study of *in vivo* retroviral-mediated gene transfer to the liver in an OTC-deficient animal model. It shows that the gene delivery system developed in normal animals must be improved before it can be applied to diseased animals.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Daniel Rabier, Caroline Rambaud, and Michèle Leborgne for their help, and to Marc Fischer for his critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. Craigen WJ, Jones S, Grompe M, et al: Orthotopic liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Hum Genet* 47:153, 1990
2. Cavard C, Grimber G, Dubois N, et al: Correction of mouse ornithine transcarbamylase deficiency by gene transfer into the germ line. *Nucleic Acids Res* 16:2099-2110, 1988
3. Jones SN, Grompe M, Munir MI, et al: Ectopic correction of ornithine transcarbamylase deficiency in sparse fur mice. *J Biol Chem* 265:14684-14690, 1990
4. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, et al: Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1:241-256, 1990
5. Morsy MA, Alford EL, Bett A, et al: Efficient adenoviral-mediated ornithine transcarbamylase expression in deficient mouse and human hepatocytes. *J Clin Invest* 92:1580-1586, 1993
6. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al: Cellular immunity to viral antigens limits E<sub>1</sub>-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4407-4411, 1994
7. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, et al: Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381, 1991
8. Blouin A, Bolender RP, Weibel EW: Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. *J Cell Biol* 72:441-445, 1977
9. Branchereau S, Calise D, Ferry N: Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther* 5:803-808, 1994
10. Brusilow SW, Horwich AL: Urea cycle enzymes, in Scriver

CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds): The metabolic basis of inherited disease—tome I. New York, NY, McGraw-Hill, 1989 pp 629-663

11. Lowy DR: Transformation and oncogenesis: Retroviruses, in Fields BN (ed): Virology. New York, NY, Raven, 1985, pp 235-263

12. Weber-Benarous A, Decaux JF, Bennoun M, et al: Retroviral infection of primary hepatocytes from normal mice and mice transgenic for SV40 large T antigen. *Exp Cell Res* 205:91-100, 1993

13. Grompe M, Jones SN, Loulseged H, et al: Retroviral-mediated gene transfer of human ornithine trans-carbamylase into

primary hepatocytes of spf and spf-ash mice. *Hum Gen Ther* 3:35-44, 1992

14. Rettinger SD, Parker Ponder K, Saylor RL, et al: In vivo hepatocyte transduction with retrovirus during in-flow occlusion. *J Surg Res* 54:418-425, 1993

15. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN, et al: In vivo gene therapy of hemophilia B: Sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 262:117-119, 1993

16. Monastiri K, Rabier D, Kamoun P: Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency: Results in sp<sup>ash</sup> mice. *Prenat Diag* 13:441-447, 1993

## Travaux en thérapie génique

### *Publications:*

- Podevin G, Ferry N, Calise D, Révillon Y. *In vivo* Retroviral-mediated Gene Transfer in Ornithine-Transcarbamylase Deficient SPFASH Mice. *J Pediatr Surg.* 1996;31:1516-1519.
- Podevin G, Ferry N, Podevin J, Oncoiba N, Sandoval C, Bralet MP, Levard G. *In vivo* Retrovirus-mediated Gene Transfer into Lamb Liver. *Eur J Pediatr Surg.* 2000;10 :167-171.
- Podevin G, Pichard V, Durand S, Aubert D, Heloury Y, Ferry N. *In vivo* retroviral mediated gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can we avoid it? *Pediatr Surg Int.* 2002 Oct;18(7):595-9.
- Podevin G, Otta E, Nguyen JM, Pichard V, Aubert D, Moullier P, Ferry N. Factors influencing immune response after *in vivo* retrovirus gene transfer to the liver. *J Gene Med.* 2004 Jan; 6(1): 16-21.
- Provost N, Le Meur G, Weber M, Mendes-Madeira A, Podevin G, Cherel Y, Colle MA, Deschamps JY, Moullier P, Rolling F. 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.* 2005 Feb;11(2):275-83.

### *Communications:*

- Podevin G, Ferry N, Calise D, Révillon Y. Mise au point de la thérapie génique du déficit en OTC, à l'aide d'un rétrovirus recombinant, sur le modèle de la souris SPFASH.  
*Présentation au:*  
Congrès de la Société Française de Recherche en Pédiatrie, Paris, septembre 1994.  
52ème congrès de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique, Paris, septembre 1995.  
4ème journée de Recherche Clinique et Fondamentale, Poitiers, septembre 1995.
- Podevin G, Ferry N, Podevin J, Oncoiba N, Sandoval C, Bralet MP, Levard G.  
Transfert de gènes *in vivo* dans le foie par des vecteurs rétroviraux chez l'agneau.  
*Présentation au:*  
5ème journée de Recherche Clinique et Fondamentale, Poitiers, novembre 1997.  
55ème congrès de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique, Paris, septembre 1998.
- Podevin J, Ferry N, Podevin G, Levard G. Transfert de gènes *in vivo* dans le foie: application à la maladie de Crigler Najjar. 7ème journée de Recherche Clinique et Fondamentale, Poitiers, septembre 1998.
- Podevin G, Ferry N, Aubert D, Leclair MD, Camby C, Heloury Y. Le transfert de gènes *in vivo* par des rétrovirus recombinants dans le foie est limité par une réaction immunitaire contre les cellules corrigées. 57ème congrès de la Société Française de Chirurgie Pédiatrique, Paris, septembre 2000.
- Aubert D, Menoret S, Izembart A, Chiari E, Podevin G, Pichard V, Tesson L, Anegon I, Moullier P, Ferry N. *In vivo* mediated correction of a liver genetic defect on the rat is blunted by an immune response against the corrected cells. European Society of Gene Therapy, Stockholm, octobre 2000.

- Podevin G, Pichard V, Durand S, Aubert D, Heloury Y, Ferry N. In vivo retroviral mediated gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can we avoid it? 14<sup>th</sup> International symposium on pediatric surgical research, Madrid, Espagne, octobre 2001.
- Podevin G, Otta E, Nguyen JM, Pichard V, Aubert D, Moullier P, Ferry N. Factors influencing immune response after in vivo retrovirus gene transfer to the liver. 15<sup>th</sup> International symposium on pediatric surgical research, Graz, Autriche, novembre 2002.
- Podevin G, Pichard V, Aubert D, Nguyen JM, Moullier P, Ferry N. Les facteurs influençant la réponse immunitaire lors du transfert de gène *in vivo* dans le foie par des rétrovirus recombinants. Forum des doctorants, Nantes, avril 2004.

## REFERENCES

1. Brunetti-Pierri N and Lee B, *Gene therapy for inborn errors of liver metabolism*. Mol Genet Metab., 2005. **86**(1-2): p. 13-24.
2. Michalopoulos GK and DeFrances MC, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
3. Thorgeirsson SS and Grisham JW, *Overview of recent experimental studies on liver stem cells*. Semin Liver Dis, 2003. **23**(4): p. 303-12.
4. Bessis N, GarciaCozar FJ, and Boissier MC, *Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms*. Gene Ther., 2004. **11**(Suppl 1): p. S10-7.
5. Puppi J, Guillonneau C, Pichard V, Bellodi-Privato M, Cuturi MC, Anegon I, and Ferry N, *Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene*. J Hepatol, 2004. **41**(2): p. 222-8.
6. Kay MA, Meuse L, Gown AM, Linsley P, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ochs HD, and Wilson CB, *Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4686-91.
7. Delves PJ and Roitt IM, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med., 2000. **343**(2): p. 108-17.
8. Grompe M, *Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases*. J Inherit Metab Dis., 2001. **24**(2): p. 231-44.
9. Ponder KP, Melniczek JR, Xu L, Weil MA, O'Malley TM, O'Donnell PA, Knox VW, Aguirre GD, Mazrier H, Ellinwood NM, Sleeper M, Maguire AM, Volk SW, Mango RL, Zweigle J, Wolfe JH,

- and Haskins ME, *Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13102-13107.
10. Nguyen TH and Ferry N, *Liver gene therapy: advances and hurdles*. Gene Ther, 2004. **11**(Suppl 1): p. S76-84.
  11. Franco LM, Sun B, Yang X, Bird A, Zhang H, Schneider A, Brown T, Young SP, Clay TM, Amalfitano A, Chen YT, and Koeberl DD, *Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II*. Mol Ther, 2005. **12**(5): p. 876-84.
  12. Overturf K, Aldhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, and Grompe M, *Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 266-273.
  13. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, and Ogawa K, *Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats*. Gastroenterology, 1996. **111**(6): p. 1654-60.
  14. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, and Oude Elferink RP, *Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1720-30.
  15. Murray K and Scott C, *Amino acid metabolism*, in *Pediatric Gastrointestinal Disease*, G.O. Walker WA, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson JR, Editor. 2004, BC Decker: Hamilton, Ontario. p. 1275-1286.
  16. Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, and Strandvik B, *Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*. Lancet, 1992. **340**(8823): p. 813-7.
  17. Holme E and Lindstedt S, *Nontransplant treatment of tyrosinemia*. Clin Liver Dis, 2000. **4**(4): p. 805-14.
  18. Al-Dhalimy M, Overturf K, Finegold M, and Grompe M, *Long-term therapy with NTBC and tyrosine-restricted diet in a murine model of hereditary tyrosinemia type I*. Mol Genet Metab, 2002. **75**(1): p. 38-45.
  19. van Spronsen FJ, Bijleveld CM, van Maldegem BT, and Wijburg FA, *Hepatocellular carcinoma in hereditary tyrosinemia type I despite*

- 2-(2 nitro-4-3 trifluoro- methylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005. **40**(1): p. 90-3.
20. Klebig ML, Russell LB, and Rinchik EM, *Murine fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) gene is disrupted by a neonatally lethal albino deletion that defines the hepatocyte-specific developmental regulation 1 (hsdr-1) locus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(4): p. 1363-7.
21. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Tanguay R, Lieber A, Kay M, and Grompe M, *Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I*. *Hum Gene Ther*, 1997. **8**(5): p. 513-21.
22. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, and Hadchouel M, *Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(1): p. 282-7.
23. Bassas A, Chehab M, Hebby H, Al Shahed M, Al Hussein H, Al Zahrani A, and Wali S, *Living related liver transplantation in 13 cases of progressive familial intrahepatic cholestasis*. *Transplant Proc.*, 2003. **35**(8): p. 3003-5.
24. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, and et al., *Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 451-62.
25. Alonso EM, Snover DC, Montag A, Freese DK, and Whitington PF, *Histologic pathology of the liver in progressive familial intrahepatic cholestasis*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1994. **18**(2): p. 128-33.
26. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, and Pierce JA, *The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase*. *Am Rev Respir Dis*, 1977. **116**(3): p. 469-75.
27. Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, Rennard SI, and Crystal RG, *Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema*. *J Clin Invest*, 1981. **68**(4): p. 889-98.
28. Sveger T, *Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants*. *N Engl J Med*, 1976. **294**(24): p. 1316-21.

29. Sveger T, *The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children*. Acta Paediatr Scand, 1988. **77**(6): p. 847-51.
30. Stoller JK and Aboussouan LS, *Alpha1-antitrypsin deficiency*. Lancet., 2005. **365**(9478): p. 2225-36.
31. Rudnick DA and Perlmutter DH, *Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease*. Hepatology, 2005. **42**(3): p. 514-21.
32. Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, and Woo SL, *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1217-21.
33. Bumgardner GL, Heining M, Li J, Xia D, Parker-Thornburg J, Ferguson RM, and Orosz CG, *A functional model of hepatocyte transplantation for in vivo immunologic studies*. Transplantation, 1998. **65**(1): p. 53-61.
34. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, Liu T, Finegold M, Darlington G, Pokorny W, and et al., *Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 89-93.
35. Kay MA, Li Q, Liu TJ, Leland F, Toman C, Finegold M, and Woo SL, *Hepatic gene therapy: persistent expression of human alpha 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery in vivo*. Hum Gene Ther, 1992. **3**(6): p. 641-7.
36. Bowles NE, Eisensmith RC, Mohuidin R, Pyron M, and Woo SL, *A simple and efficient method for the concentration and purification of recombinant retrovirus for increased hepatocyte transduction in vivo*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(14): p. 1735-42.
37. Song S, Embury J, Laipis PJ, Berns KI, Crawford JM, and Flotte TR, *Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors*. Gene Ther., 2001. **8**(17): p. 1299-306.
38. Davies JC, Geddes DM, and Alton EW, *Prospects for gene therapy in lung disease*. Curr Opin Pharmacol, 2001. **1**(3): p. 272-7.
39. Song S, Morgan M, Ellis T, Poirier A, Chesnut K, Wang J, Brantly M, Muzyczka N, Byrne BJ, Atkinson M, and Flotte TR, *Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle*

- transduced with adeno-associated virus vectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14384-8.
40. Stecenko AA and Brigham KL, *Gene therapy progress and prospects: alpha-1 antitrypsin*. Gene Ther., 2003. **10**(2): p. 95-9.
41. Brigham KL, Lane KB, Meyrick B, Stecenko AA, Strack S, Cannon DR, Caudill M, and Canonico AE, *Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(7): p. 1023-32.
42. Flotte TR, Brantly ML, Spencer LT, Byrne BJ, Spencer CT, Baker DJ, and Humphries M, *Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults*. Hum Gene Ther., 2004. **15**(1): p. 93-128.
43. Feldstein A, Chitkara D, Plescomw R, and Grand R, *Wilson disease*, in *Pediatric Gastrointestinal Disease*, G.O. Walker WA, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson JR, Editor. 2004, BC Decker: Hamilton, Ontario. p. 1440-1454.
44. Schilsky ML, Scheinberg IH, and Sternlieb I, *Liver transplantation for Wilson's disease: indications and outcome*. Hepatology, 1994. **19**(3): p. 583-7.
45. Wilkinson ML, Portmann B, and Williams R, *Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper*. Gut, 1983. **24**(8): p. 767-71.
46. Guan R, Oon CJ, Wong PK, Foong WC, and Wee A, *Primary hepatocellular carcinoma associated with Wilson's disease in a young woman*. Postgrad Med J, 1985. **61**(714): p. 357-9.
47. Polio J, Enriquez RE, Chow A, Wood WM, and Atterbury CE, *Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature*. J Clin Gastroenterol, 1989. **11**(2): p. 220-4.
48. Terada K, Nakako T, Yang XL, Iida M, Aiba N, Minamiya Y, Nakai M, Sakaki T, Miura N, and Sugiyama T, *Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1815-20.
49. Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schilsky ML, and Gupta S, *Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(2): p. 438-47.

50. Nassogne MC, Heron B, Touati G, Rabier D, and Saudubray JM, *Urea cycle defects: management and outcome*. J Inherit Metab Dis, 2005. **28**(3): p. 407-14.
51. Podevin G, Ferry N, Calise D, and Revillion Y, *In vivo retroviral-mediated transfer of a marker-gene in ornithine transcarbamylase-deficient Spf(ash) mice*. J Pediatr Surg, 1996. **31**(11): p. 1516-9.
52. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, and Briand P, *Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector*. Hum Gene Ther, 1990. **1**(3): p. 241-56.
53. Kiwaki K, Kanegae Y, Saito I, Komaki S, Nakamura K, Miyazaki JI, Endo F, and Matsuda I, *Correction of ornithine transcarbamylase deficiency in adult spf(ash) mice and in OTC-deficient human hepatocytes with recombinant adenoviruses bearing the CAG promoter*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(7): p. 821-30.
54. Ye X, Robinson MB, Pabin C, Quinn T, Jawad A, Wilson JM, and Batshaw ML, *Adenovirus-mediated in vivo gene transfer rapidly protects ornithine transcarbamylase-deficient mice from an ammonium challenge*. Pediatr Res, 1997. **41**(4 Pt 1): p. 527-34.
55. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, and Fox IJ, *Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder*. Pediatrics, 2003. **111**(6 Pt 1): p. 1262-7.
56. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, and Rela M, *One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation*. Transplantation, 2004. **77**(10): p. 1614-6.
57. Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Probert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, and Batshaw ML, *A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(1): p. 163-75.
58. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, and Batshaw ML, *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(1-2): p. 148-58.

59. Waddington SN, Kennea NL, Buckley SM, Gregory LG, Themis M, and Coutelle C, *Fetal and neonatal gene therapy: benefits and pitfalls*. Gene Ther, 2004. **11**(Suppl 1): p. S92-7.
60. Assogba U, Dairou F, Turpin G, and Bruckert E, *LDL-traitement par aphérèse, méthodes et indications*. Presse Med, 1999. **28**(18): p. 985-91.
61. Bilheimer DW, *Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia*. Arteriosclerosis, 1989. **9**(1 Suppl): p. I158-63.
62. Starzl TE, Bilheimer DW, Bahnson HT, Shaw BW, Jr., Hardesty RL, Griffith BP, Iwatsuki S, Zitelli BJ, Gartner JC, Jr., Malatack JJ, and et al., *Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia*. Lancet, 1984. **1**(8391): p. 1382-3.
63. Naoumova RP, Thompson GR, and Soutar AK, *Current management of severe homozygous hypercholesterolaemias*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(4): p. 413-22.
64. Eguchi S, Rozga J, Lebow LT, Chen SC, Wang CC, Rosenthal R, Fogli L, Hewitt WR, Middleton Y, and Demetriou AA, *Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus*. Transplantation, 1996. **62**(5): p. 588-93.
65. Wilson JM, Chowdhury NR, Grossman M, Wajsman R, Epstein A, Mulligan RC, and Chowdhury JR, *Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8437-41.
66. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR, Jr., and Wilson JM, *Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1802-5.
67. Li J, Fang B, Eisensmith RC, Li XH, Nasonkin I, Lin-Lee YC, Mims MP, Hughes A, Montgomery CD, Roberts JD, and et al., *In vivo gene therapy for hyperlipidemia: phenotypic correction in Watanabe rabbits by hepatic delivery of the rabbit LDL receptor gene*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 768-73.
68. Kankkonen HM, Vahakangas E, Marr RA, Pakkanen T, Laurema A, Leppanen P, Jalkanen J, Verma IM, and Yla-Herttuala S, *Long-term lowering of plasma cholesterol levels in LDL-receptor-deficient WHHL rabbits by gene therapy*. Mol Ther, 2004. **9**(4): p. 548-56.

69. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, and Wilson JM, *Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia*. Nat Genet, 1994. **6**(4): p. 335-41.
70. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB, Jr., Raper SE, and et al., *A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia*. Nat Med, 1995. **1**(11): p. 1148-54.
71. Themis M, Schneider H, Kiserud T, Cook T, Adebakin S, Jezard S, Forbes S, Hanson M, Pavirani A, Rodeck C, and Coutelle C, *Successful expression of beta-galactosidase and factor IX transgenes in fetal and neonatal sheep after ultrasound-guided percutaneous adenovirus vector administration into the umbilical vein*. Gene Ther, 1999. **6**(7): p. 1239-48.
72. Schneider H, Muhle C, Douar AM, Waddington S, Jiang QJ, von der Mark K, Coutelle C, and Rascher W, *Sustained delivery of therapeutic concentrations of human clotting factor IX--a comparison of adenoviral and AAV vectors administered in utero*. J Gene Med, 2002. **4**(1): p. 46-53.
73. Waddington SN, Buckley SM, Nivsarkar M, Jezard S, Schneider H, Dahse T, Kembell-Cook G, Miah M, Tucker N, Dallman MJ, Themis M, and Coutelle C, *In utero gene transfer of human factor IX to fetal mice can induce postnatal tolerance of the exogenous clotting factor*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1359-66.
74. Waddington SN, Nivsarkar MS, Mistry AR, Buckley SM, Kembell-Cook G, Mosley KL, Mitrophanous K, Radcliffe P, Holder MV, Brittan M, Georgiadis A, Al-Allaf F, Bigger BW, Gregory LG, Cook HT, Ali RR, Thrasher A, Tuddenham EG, Themis M, and Coutelle C, *Permanent phenotypic correction of hemophilia B in immunocompetent mice by prenatal gene therapy*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2714-21.
75. Kay MA, Rothenberg S, Landen CN, Bellinger DA, Leland F, Toman C, Finegold M, Thompson AR, Read MS, Brinkhous KM, and et al., *In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs*. Science, 1993. **262**(5130): p. 117-9.
76. Smith TA, Mehaffey MG, Kayda DB, Saunders JM, Yei S, Trapnell BC, McClelland A, and Kaleko M, *Adenovirus mediated*

- expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice.* Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 397-402.
77. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, Gown AM, Winther B, Meuse L, Cohen LK, Thompson AR, and Kay MA, *Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors.* Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 270-6.
78. Kren BT, Bandyopadhyay P, and Steer CJ, *In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides.* Nat Med, 1998. **4**(3): p. 285-90.
79. Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, and Kay MA, *Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors.* Nat Med, 1999. **5**(1): p. 64-70.
80. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellinger DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, and High KA, *Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector.* Nat Med, 1999. **5**(1): p. 56-63.
81. Xu L, Daly T, Gao C, Flotte TR, Song S, Byrne BJ, Sands MS, and Parker Ponder K, *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, 2001. **12**(5): p. 563-573.
82. Nathwani AC, Davidoff AM, Hanawa H, Hu Y, Hoffer FA, Nikanorov A, Slaughter C, Ng CY, Zhou J, Lozier JN, Mandrell TD, Vanin EF, and Nienhuis AW, *Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques.* Blood, 2002. **100**(5): p. 1662-1669.
83. Ehrhardt A, Xu H, Dillow AM, Bellinger DA, Nichols TC, and Kay MA, *A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2403-11.
84. Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S, Matsushita T, Allen J, Surosky R, Lochrie M, Meuse L, McClelland A,

- Colosi P, and Kay MA, *Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2412-9.
85. Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, and Naldini L, *Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3700-9.
86. Chao H and Walsh CE, *AAV vectors for hemophilia B gene therapy*. *Mt Sinai J Med*, 2004. **71**(5): p. 305-13.
87. Arruda VR, Stedman HH, Nichols TC, Haskins ME, Nicholson M, Herzog RW, Couto LB, and High KA, *Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model*. *Blood*, 2005. **105**(9): p. 3458-64.
88. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, and High KA, *Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector*. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 257-61.
89. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, and Glader B, *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2963-72.
90. Powell JS, Ragni MV, White GC, 2nd, Lusher JM, Hillman-Wiseman C, Moon TE, Cole V, Ramanathan-Girish S, Roehl H, Sajjadi N, Jolly DJ, and Hurst D, *Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion*. *Blood*, 2003. **102**(6): p. 2038-45.
91. High KA, *Clinical gene transfer studies for hemophilia B*. *Semin Thromb Hemost.*, 2004. **30**(2): p. 257-67.
92. Hsieh M-Y, Khazi FR, Schlachterman A, Liu Y-L, and High KA, *Persistence of AAV Capsid in Transduced Cells*. *Mol Ther*, 2005. **11**(Supplement 1): p. S5-6.
93. Manno CS, Arruda VR, Pierce GF, Glader B, Ragni M, Rasko J, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M,

- Zajko A, Zehnder J, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozi F, Couto L, Ertl HC, High KA, and Kay MA, *Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response*. Nat Med, 2006. **12**: p. 12.
94. Gourley G, *Bilirubin metabolism*, in *Pediatric Gastrointestinal Disease*, G.O. Walker WA, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson JR, Editor. 2004, BC Decker: Hamilton, Ontario. p. 1344-1362.
95. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, and Chowdhury NR, *Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype*. Hum Mutat, 2000. **16**(4): p. 297-306.
96. Shevell MI, Majnemer A, and Schiff D, *Neurologic perspectives of Crigler-Najjar syndrome type I*. J Child Neurol, 1998. **13**(6): p. 265-9.
97. Demetriou AA, Levenson SM, Novikoff PM, Novikoff AB, Chowdhury NR, Whiting J, Reisner A, and Chowdhury JR, *Survival, organization, and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7475-9.
98. Dixit V, Darvasi R, Arthur M, Brezina M, Lewin K, and Gitnick G, *Restoration of liver function in Gunn rats without immunosuppression using transplanted microencapsulated hepatocytes*. Hepatology, 1990. **12**(6): p. 1342-9.
99. Bruni S and Chang TM, *Encapsulated hepatocytes for controlling hyperbilirubinemia in Gunn rats*. Int J Artif Organs, 1991. **14**(4): p. 239-41.
100. Cubero FJ, Arza E, Maganto P, Barrutia G, Mula N, Ortiz A, and Arahuetes RM, *Expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (bUGT) throughout fetal development: intrasplenic transplantation into Gunn rats to correct enzymatic deficiency*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(12): p. 2762-7.
101. Roy-Chowdhury N, Kadakol A, Sappal BS, Thummala NR, Ghosh SS, Lee SW, and Roy-Chowdhury J, *Gene therapy for inherited hyperbilirubinemias*. J Perinatol, 2001. **21**(Suppl 1): p. S114-8; discussion S125-7.

102. Li Q, Murphree SS, Willer SS, Bolli R, and French BA, *Gene therapy with bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type 1*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(4): p. 497-505.
103. Thummala NR, Ghosh SS, Lee SW, Reddy B, Davidson A, Horwitz MS, Chowdhury JR, and Chowdhury NR, *A non-immunogenic adenoviral vector, coexpressing CTLA4Ig and bilirubin-uridine-diphosphoglucuronateglucuronosyltransferase permits long-term, repeatable transgene expression in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome*. Gene Ther, 2002. **9**(15): p. 981-90.
104. Toietta G, Mane VP, Norona WS, Finegold MJ, Ng P, McDonagh AF, Beaudet AL, and Lee B, *Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 3930-5.
105. Branchereau S, Ferry N, Myara A, Sato H, Kowai O, Trivin F, Houssin D, Danos O, and Heard J, *Correction of bilirubin glucuronyl transferase in Gunn rats by gene transfer in the liver using retroviral vectors*. Chirurgie, 1993. **119**(10): p. 642-648.
106. Tada K, Chowdhury NR, Neufeld D, Bosma PJ, Heard M, Prasad VR, and Chowdhury JR, *Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo*. Liver Transpl Surg, 1998. **4**(1): p. 78-88.
107. Wilke M, Bijma A, Timmers-Reker AJ, Scholte BJ, and Sinaasappel M, *Complementation of the genetic defect in Gunn rat hepatocytes in vitro by highly efficient gene transfer with cationic liposomes*. Gene Ther, 1997. **4**(12): p. 1305-12.
108. Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, and Steer CJ, *Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10349-54.
109. Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trivin F, and Ferry N, *Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 431-8.
110. Nguyen TH, Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trono D, and Ferry N, *Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats*. Mol Ther, 2005. **12**(5): p. 852-9.

111. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, and Strom SC, *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. N Engl J Med, 1998. **338**(20): p. 1422-6.
112. Silverman EK, Miletich JP, Pierce JA, Sherman LA, Endicott SK, Broze GJ, Jr., and Campbell EJ, *Alpha-1-antitrypsin deficiency. High prevalence in the St. Louis area determined by direct population screening*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(4): p. 961-6.
113. Filipponi F, Pisati R, Cavicchini G, Ulivieri MI, Ferrara R, and Mosca F, *Cost and outcome analysis and cost determinants of liver transplantation in a European National Health Service hospital*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1731-6.
114. Karaman MI, Zulfikar B, Caskurlu T, and Ergenekon E, *Circumcision in hemophilia: a cost-effective method using a novel device*. J Pediatr Surg, 2004. **39**(10): p. 1562-4.
115. Burdelski M and Rogiers X, *Liver transplantation in metabolic disorders*. Acta Gastroenterol Belg, 1999. **62**(3): p. 300-5.
116. Slooff MJ, *Reduced size liver transplantation, split liver transplantation, and living related liver transplantation in relation to the donor organ shortage*. Transpl Int, 1995. **8**(1): p. 65-8.
117. Toso C, Ris F, Mentha G, Oberholzer J, Morel P, and Majno P, *Potential impact of in situ liver splitting on the number of available grafts*. Transplantation, 2002. **74**(2): p. 222-6.
118. Curran C, *Adult-to-adult living donor liver transplantation: history, current practice, and implications for the future*. Prog Transplant, 2005. **15**(1): p. 36-42; quiz 43-4.
119. Shlomai A and Shaul Y, *RNA interference--small RNAs effectively fight viral hepatitis*. Liver Int, 2004. **24**(6): p. 526-31.
120. Sangro B, Herraiz M, and Prieto J, *Gene therapy of neoplastic liver diseases*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(2): p. 135-48.
121. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, and Lieberman J, *RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 347-51.
122. Arbuthnot PB, Bralet MP, Le Jossic C, Dedieu JF, Perricaudet M, Brechot C, and Ferry N, *In vitro and in vivo hepatoma cell-specific expression of a gene transferred with an adenoviral vector*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(13): p. 1503-14.
123. Gerolami R, Cardoso J, Bralet MP, Cuenod CA, Clement O, Tran PL, and Brechot C, *Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene*

- transfer to rat hepatocarcinomas by selective administration into the hepatic artery.* Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 896-904.
124. Bilbao R, Bustos M, Alzuguren P, Pajares MJ, Drozdziak M, Qian C, and Prieto J, *A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds.* Gene Ther, 2000. **7**(21): p. 1824-32.
125. Gupta S, Vasa SR, Rajvanshi P, Zuckier LS, Palestro CJ, and Bhargava KK, *Analysis of hepatocyte distribution and survival in vascular beds with cells marked by 99mTC or endogenous dipeptidyl peptidase IV activity.* Cell Transplant, 1997. **6**(4): p. 377-86.
126. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, and Gupta S, *Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule.* Hepatology, 1996. **23**(3): p. 482-96.
127. Gupta S, Aragona E, Vemuru RP, Bhargava KK, Burk RD, and Chowdhury JR, *Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation.* Hepatology, 1991. **14**(1): p. 144-9.
128. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, and Burlina AB, *Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a.* Lancet, 2002. **359**(9303): p. 317-8.
129. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, and Gupta S, *Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents.* Gastroenterology, 1996. **111**(4): p. 1092-1102.
130. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, and Soriano HE, *Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up.* Transplantation, 2003. **76**(4): p. 735-8.
131. Slehria S, Rajvanshi P, Ito Y, Sokhi RP, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, and Gupta S, *Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver.* Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1320-8.
132. Malhi H, Annamaneni P, Slehria S, Joseph B, Bhargava KK, Palestro CJ, Novikoff PM, and Gupta S, *Cyclophosphamide disrupts*

- hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver.* Hepatology, 2002. **36**(1): p. 112-21.
133. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, and Gupta S, *Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver.* Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1677-85.
134. Gupta S, Rajvanshi P, Aragona E, Lee CD, Yerneni PR, and Burk RD, *Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl<sub>4</sub> treatment and hepatocyte growth factor infusion.* Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 1): p. G629-38.
135. Guha C, Sharma A, Gupta S, Alfieri A, Gorla GR, Gagandeep S, Sokhi R, Roy-Chowdhury N, Tanaka KE, Vikram B, and Roy-Chowdhury J, *Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation.* Cancer Res, 1999. **59**(23): p. 5871-4.
136. Malhi H, Gorla GR, Irani AN, Annamaneni P, and Gupta S, *Cell transplantation after oxidative hepatic preconditioning with radiation and ischemia-reperfusion leads to extensive liver repopulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13114-9.
137. Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, and Soriano HE, *Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride.* Transplantation, 2002. **73**(11): p. 1818-24.
138. Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, and Trono D, *Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes.* Mol Ther, 2002. **6**(2): p. 199-209.
139. Held PK, Olivares EC, Aguilar CP, Finegold M, Calos MP, and Grompe M, *In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery.* Mol Ther, 2005. **11**(3): p. 399-408.
140. Wu GY, Wilson JM, Shalaby F, Grossman M, Shafritz DA, and Wu CH, *Receptor-mediated gene delivery in vivo. Partial correction of genetic analbuminemia in Nagase rats.* J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14338-42.
141. Herweijer H and Wolff JA, *Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy.* Gene Ther, 2003. **10**(6): p. 453-8.
142. Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, Kameda S, Iino N, Kazama JJ, Takahashi N, Sugawa M, Hanawa H, Tada N, Miyazaki J,

- and Gejyo F, *High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection*. J Gene Med, 2002. **4**(3): p. 333-41.
143. Bridges CR, Burkman JM, Malekan R, Konig SM, Chen H, Yarnall CB, Gardner TJ, Stewart AS, Stecker MM, Patterson T, and Stedman HH, *Global cardiac-specific transgene expression using cardiopulmonary bypass with cardiac isolation*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(6): p. 1939-46.
144. Su LT, Gopal K, Wang Z, Yin X, Nelson A, Kozyak BW, Burkman JM, Mitchell MA, Low DW, Bridges CR, and Stedman HH, *Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector*. Circulation, 2005. **112**(12): p. 1780-8.
145. Gonin P, Arandel L, Van Wittenberghe L, Marais T, Perez N, and Danos O, *Femoral intra-arterial injection: a tool to deliver and assess recombinant AAV constructs in rodents whole hind limb*. J Gene Med, 2005. **7**(6): p. 782-91.
146. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budker V, Lewis DL, Herweijer H, and Wolff JA, *A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs*. Mol Ther, 2004. **10**(2): p. 386-98.
147. Jia Z and Danko I, *Long-term correction of hyperbilirubinemia in the Gunn Rat by repeated intravenous delivery of naked plasmid DNA into muscle*. Mol Ther, 2005. **11**: p. 11.
148. Berkner KL, *Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes*. Biotechniques., 1988. **6**(7): p. 616-29.
149. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, Gant TW, Thorgeirsson SS, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, and et al., *Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver*. Nat Genet, 1992. **1**(5): p. 372-8.
150. Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, and Woo SL, *Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy*. Hum Gene Ther, 1993. **4**(4): p. 403-9.
151. Yang Y, Jooss KU, Su Q, Ertl HC, and Wilson JM, *Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo*. Gene Ther, 1996. **3**(2): p. 137-44.
152. Yang Y, Su Q, Grewal IS, Schilz R, Flavell RA, and Wilson JM, *Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune*

- responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues.* J Virol, 1996. **70**(9): p. 6370-7.
153. Ilan Y, Attavar P, Takahashi M, Davidson A, Horwitz MS, Guida J, Chowdhury NR, and Chowdhury JR, *Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats.* J Clin Invest, 1996. **98**(11): p. 2640-7.
154. Jooss K, Yang Y, and Wilson JM, *Cyclophosphamide diminishes inflammation and prolongs transgene expression following delivery of adenoviral vectors to mouse liver and lung.* Hum Gene Ther, 1996. **7**(13): p. 1555-66.
155. Ilan Y, Jona VK, Sengupta K, Davidson A, Horwitz MS, Roy-Chowdhury N, and Roy-Chowdhury J, *Transient immunosuppression with FK506 permits long-term expression of therapeutic genes introduced into the liver using recombinant adenoviruses in the rat.* Hepatology, 1997. **26**(4): p. 949-56.
156. Ilan Y, Prakash R, Davidson A, Jona, Droguett G, Horwitz MS, Chowdhury NR, and Chowdhury JR, *Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 1098-106.
157. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, and Kochanek S, *Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity.* Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 180-3.
158. Jozkowicz A and Dulak J, *Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy.* Acta Biochim Pol, 2005. **52**(3): p. 589-99.
159. Ilan Y, Droguett G, Chowdhury NR, Li Y, Sengupta K, Thummala NR, Davidson A, Chowdhury JR, and Horwitz MS, *Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2587-92.
160. Morral N, O'Neal W, Rice K, Leland M, Kaplan J, Piedra PA, Zhou H, Parks RJ, Velji R, Aguilar-Cordova E, Wadsworth S, Graham FL, Kochanek S, Carey KD, and Beaudet AL, *Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12816-21.

161. Brown BD, Shi CX, Powell S, Hurlbut D, Graham FL, and Lillicrap D, *Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A*. *Blood*, 2004. **103**(3): p. 804-10.
162. Dummer R, Hassel JC, Fellenberg F, Eichmuller S, Maier T, Slos P, Acres B, Bleuzen P, Bataille V, Squiban P, Burg G, and Urosevic M, *Adenovirus-mediated intralesional interferon-gamma gene transfer induces tumor regressions in cutaneous lymphomas*. *Blood*, 2004. **104**(6): p. 1631-8. .
163. Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Beaudet AL, Carey KD, Finegold M, and Ng P, *Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates*. *Hum Gene Ther.*, 2004. **15**(1): p. 35-46.
164. Palmer DJ and Ng P, *Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy*. *Hum Gene Ther.*, 2005. **16**(1): p. 1-16.
165. Fischer A and Cavazzana-Calvo M, *Integration of retroviruses: a fine balance between efficiency and danger*. *PLoS Med.*, 2005. **2**(1): p. e10.
166. Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, and Heard JM, *Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8377-81.
167. Kitten O, Cosset FL, and Ferry N, *Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo*. *Hum Gene Ther*, 1997. **8**(12): p. 1491-4.
168. Bosch A, McCray PB, Jr., Chang SM, Ulich TR, Simonet WS, Jolly DJ, and Davidson BL, *Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances in vivo retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(12): p. 2683-7.
169. Bowling WM, Kennedy SC, Cai SR, Duncan JR, Gao C, Flye MW, and Ponder KP, *Portal branch occlusion safely facilitates in vivo retroviral vector transduction of rat liver*. *Hum Gene Ther*, 1996. **7**(17): p. 2113-21.
170. Pichard V, Aubert D, and Ferry N, *Efficient retroviral gene transfer to the liver in vivo using nonpolypeptidic mitogens*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **286**(5): p. 929-35.
171. Wu X, Li Y, Crise B, and Burgess SM, *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. *Science*, 2003. **300**(5626): p. 1749-51.

172. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, and Cavazzana-Calvo M, *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science., 2003. **302**(5644): p. 415-9.
173. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, and Cavazzana-Calvo M, *Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X: efficacité et complications*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(1): p. 115-7.
174. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, and Bushman FD, *Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences*. PLoS Biol., 2004. **2**(8): p. E234.
175. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, and Trono D, *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
176. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, and Verma IM, *Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 314-7.
177. Hofmann W, Schubert D, LaBonte J, Munson L, Gibson S, Scammell J, Ferrigno P, and Sodroski J, *Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 10020-8.
178. Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, and Kay MA, *Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 49-52.
179. Ohashi K, Park F, and Kay MA, *Role of hepatocyte direct hyperplasia in lentivirus-mediated liver transduction in vivo*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(5): p. 653-63.
180. Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, and Naldini L, *Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(2): p. 243-60.
181. van Til NP, Markusic DM, van der Rijt R, Kunne C, Hiralall JK, Vreeling H, Frederiks WM, Oude-Elferink RP, and Seppen J, *Kupffer*

- cells and not liver sinusoidal endothelial cells prevent lentiviral transduction of hepatocytes.* Mol Ther., 2005. **11**(1): p. 26-34.
182. Mingozzi F, Liu YL, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, Arruda VR, High KA, and Herzog RW, *Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer.* J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1347-56.
183. Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, and Wilson JM, *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2002. **99**(18): p. 11854-9.
184. Sarkar R, Tetreault R, Gao G, Wang L, Bell P, Chandler R, Wilson JM, and Kazazian HH, Jr., *Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype.* Blood, 2004. **103**(4): p. 1253-60.
185. Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, and Kay MA, *Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice.* J Virol, 2005. **79**(1): p. 214-24.
186. Davidoff AM, Gray JT, Ng CY, Zhang Y, Zhou J, Spence Y, Bakar Y, and Nathwani AC, *Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models.* Mol Ther, 2005. **11**(6): p. 875-88.
187. Sun B, Zhang H, Franco LM, Young SP, Schneider A, Bird A, Amalfitano A, Chen YT, and Koeberl DD, *Efficacy of an adeno-associated virus 8-pseudotyped vector in glycogen storage disease type II.* Mol Ther., 2005. **11**(1): p. 57-65.
188. Wang L, Calcedo R, Nichols TC, Bellinger DA, Dillow A, Verma IM, and Wilson JM, *Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy.* Blood., 2005. **105**(8): p. 3079-86.
189. Chuah MK, Collen D, and VandenDriessche T, *Clinical gene transfer studies for hemophilia A.* Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(2): p. 249-56.
190. Nathwani AC, McIntosh J, and Davidoff AM, *An update on gene therapy for hemophilia.* Curr Hematol Rep, 2005. **4**(4): p. 287-93.
191. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, and Wilson JM, *Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4407-11.

192. Yang Y, Su Q, and Wilson JM, *Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 7209-12.
193. Gao G, Lu Y, Calcedo R, Grant RL, Bell P, Wang L, Figueredo J, Lock M, and Wilson JM, *Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates*. Mol Ther., 2006. **13**(1): p. 77-87.
194. Muruve DA, *The innate immune response to adenovirus vectors*. Hum Gene Ther., 2004. **15**(12): p. 1157-66.
195. Izembart A, Aguado E, Gauthier O, Aubert D, Moullier P, and Ferry N, *In vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(18): p. 2917-2925.
196. Aubert D, Menoret S, Chiari E, Pichard V, Durand S, Tesson L, Moullier P, Anegon I, and Ferry N, *Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat*. Mol Ther, 2002. **5**(4): p. 388-396.
197. VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z, Collen D, and Chuah MK, *Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo*. Blood, 2002. **100**(3): p. 813-22.
198. Sarukhan A, Camugli S, Gjata B, von Boehmer H, Danos O, and Jooss K, *Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 269-77.
199. Favre D, Blouin V, Provost N, Spisek R, Porrot F, Bohl D, Marme F, Cherel Y, Salvetti A, Hurtrel B, Heard JM, Riviere Y, and Moullier P, *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, 2002. **76**(22): p. 11605-11.
200. Aubert D, Pichard V, Durand S, Moullier P, and Ferry N, *Cytotoxic immune response after retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat does not preclude expression from adeno-associated virus 1 transduced muscles*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(5): p. 473-81.
201. Bellodi-Privato M, Le Meur G, Aubert D, Mendes-Madera A, Pichard V, Rolling F, and Ferry N, *AAV gene transfer to the retina*

*does not protect retrovirally transduced hepatocytes from the immune response.* J Mol Med, 2004. **82**(6): p. 403-10.

202. Irwin MJ, Laube LS, Lee V, Austin M, Chada S, Anderson CG, Townsend K, Jolly DJ, and Warner JF, *Direct injection of a recombinant retroviral vector induces human immunodeficiency virus-specific immune responses in mice and nonhuman primates.* J Virol, 1994. **68**(8): p. 5036-44.

203. Townsend K, Sallberg M, O'Dea J, Banks T, Driver D, Sauter S, Chang SM, Jolly DJ, Mento SJ, Milich DR, and Lee WT, *Characterization of CD8+ cytotoxic T-lymphocyte responses after genetic immunization with retrovirus vectors expressing different forms of the hepatitis B virus core and e antigens.* J Virol, 1997. **71**(5): p. 3365-74.

204. Pastore L, Morral N, Zhou H, Garcia R, Parks RJ, Kochanek S, Graham FL, Lee B, and Beaudet AL, *Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors.* Hum Gene Ther, 1999. **10**(11): p. 1773-81.

205. Pinto VB, Prasad S, Yewdell J, Bennink J, and Hughes SH, *Restricting expression prolongs expression of foreign genes introduced into animals by retroviruses.* J Virol, 2000. **74**(21): p. 10202-10206.

206. Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiyama K, Mizukami H, Hamajima K, Nomiyama H, Saito T, Imai M, Monahan J, Okuda K, Ozawa K, and Okuda K, *A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus.* Hum Gene Ther, 2001. **12**(9): p. 1047-1061.

207. Manning WC, Paliard X, Zhou S, Pat Bland M, Lee AY, Hong K, Walker CM, Escobedo JA, and Dwarki V, *Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D.* J Virol, 1997. **71**(10): p. 7960-7972.

208. Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, and Wilson JM, *Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers.* J Virol, 1998. **72**(5): p. 4212-23.

209. Fields PA, Kowalczyk DW, Arruda VR, Armstrong E, McClelland ML, Hagstrom JN, Pasi KJ, Ertl HC, Herzog RW, and High KA, *Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX.* Mol Ther, 2000. **1**(3): p. 225-235.

210. Nathwani AC, Davidoff A, Hanawa H, Zhou JF, Vanin EF, and Nienhuis AW, *Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1258-1265.
211. Fortner JG, Shiu MH, Kinne DW, Kim DK, Castro EB, Watson RC, Howland WS, and Beattie EJ, Jr., *Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion*. Ann Surg, 1974. **180**(4): p. 644-52.
212. Cardoso JE, Branchereau S, Jeyaraj PR, Houssin D, Danos O, and Heard JM, *In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver*. Hum Gene Ther, 1993. **4**(4): p. 411-8.
213. Rettinger SD, Ponder KP, Saylor RL, Kennedy SC, Hafenrichter DG, and Flye MW, *In vivo hepatocyte transduction with retrovirus during in-flow occlusion*. J Surg Res, 1993. **54**(5): p. 418-25.
214. Podevin G, Podevin J, Ongoiba N, Sandoval C, Bralet MP, Ferry N, and Levard G, *In vivo retrovirus-mediated gene transfer into lamb liver*. Eur J Pediatr Surg, 2000. **10**(3): p. 167-71.
215. Podevin G, Pichard V, Durand S, Aubert D, Heloury Y, and Ferry N, *In-vivo retroviral gene transfer to the liver is cancelled by an immune response against the corrected cells. Can it be avoided?* Pediatr Surg Int, 2002. **18**(7): p. 595-9.
216. Podevin G, Otta E, Nguyen JM, Pichard V, Aubert D, Moullier P, and Ferry N, *Factors influencing immune response after in vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver*. J Gene Med, 2004. **6**(1): p. 16-21.
217. Crespo A, Peydro A, Dasi F, Benet M, Calvete JJ, Revert F, and Alino SF, *Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles*. Gene Ther., 2005. **12**(11): p. 927-35.

## APPROCHE CHIRURGICALE DE LA THERAPIE GENIQUE *IN VIVO* DES MALADIES HEREDITAIRES DU FOIE

Idéalement, la thérapie génique des hépatopathies héréditaires doit permettre une synthèse continue d'une protéine thérapeutique active. Néanmoins, les transferts de gène hautement efficaces obtenus dans les hépatocytes *in vivo* se traduisent par une expression transitoire du transgène, du fait de l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit de celui-ci. Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons développé chez le rat une approche chirurgicale dans laquelle l'administration des vecteurs a été effectuée grâce à une perfusion du foie après exclusion vasculaire complète. En vue d'un essai clinique, nous avons aussi appliqué des techniques chirurgicales de perfusion hépatique sur deux modèles de grands animaux, l'agneau et le macaque.

Nos travaux ont montré que : (1) le foie isolé-perfusé et la purification du surnageant viral afin d'enlever la protéine soluble transgénique sont tous deux nécessaires pour diminuer de manière significative la réponse immunitaire, (2) les interventions chirurgicales ont été bien tolérées dans les deux espèces de grands animaux, (3) les hépatocytes du foie des agneaux n'ont pas été facilement accessibles aux vecteurs viraux, probablement à cause d'une membrane basale épaisse.

En conclusion, la technique de perfusion avec exclusion vasculaire pour le transfert de gène *in vivo* dans le foie est un bon moyen d'obtenir une expression durable de la protéine thérapeutique. Le primate non-humain est le seul modèle qui peut permettre de clairement définir le potentiel de la thérapie génique du foie en pratique clinique.

Ideally, gene therapy for inherited diseases should result in indefinite synthesis of fully active therapeutic protein. Nevertheless, highly efficient gene transfer into hepatocytes *in vivo* resulted in transient expression of the transgene, due to induction of an immune response against the transgene product.

To circumvent this drawback, we developed in rats a surgical approach in which vectors administration was performed through asanguineous perfusion of the liver after complete vascular exclusion. In sight of clinical trial, we also applied surgical techniques of liver perfusion on two large animal models, the lamb and the macaque.

Our works demonstrated that: (1) both asanguineous perfusion of the liver together with purification of the viral supernatant in order to remove soluble transgenic protein were required to decrease significantly immune response, (2) surgical procedures were well tolerated in the two large animal species, and (3) hepatocytes in lamb liver were not easily accessible to viral vectors probably because of thick basal lamina.

In conclusion, asanguineous perfusion for *in vivo* liver gene transfer is a good way to obtain sustained expression of the transgenic protein. Non-human primate is the only relevant model to clearly define the potential of liver gene therapy in clinics.