

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE

**ÉTUDE DU *TRANS*-ÉPISSAGE COMME OUTIL DE THÉRAPIE  
GÉNIQUE DANS LE MODÈLE CANIN DE LA  
MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE VII**

**THÈSE DE DOCTORAT**

École doctorale : Chimie-Biologie  
Discipline : Médecine  
Spécialité : Biologie Moléculaire

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**SACHOT Sylvain**

Le 19 Mars 2009, devant le jury ci-dessous

**Président du jury :** Professeur Yan Cherel  
**Rapporteurs :** Professeur Jean Christophe Pages  
Docteur Eric Kremer  
**Examineur :** Docteur Richard Snyder  
**Directeur de thèse :** Docteur Philippe Moullier

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>0</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>1 LA THERAPIE GENIQUE PAR TRANSFERT DE GENE</b> .....	<b>9</b>
1.1 CHOIX DU VECTEUR.....	11
1.1.1 En fonction de son tropisme.....	11
1.1.2 En fonction de son maintien dans la cellule cible.....	12
1.1.3 En fonction de son immunogénicité .....	13
1.2 CONSTRUCTION DE LA CASSETTE D'EXPRESSION.....	14
1.3 CHOIX DE LA VOIE D'INJECTION .....	15
1.4 PROBLEMES LIES AU TRANSFERT DE GENE DANS LES MALADIES GENETIQUES MONOGENIQUES.....	15
1.4.1 Oncogenèse.....	15
1.4.2 Taille d'encapsulation des vecteurs viraux.....	17
1.4.3 Contrôle du niveau et du site d'expression de la protéine.....	19
1.4.4 Remaniements épigénétiques de la cassette d'expression .....	20
1.4.5 Réponses immunitaires .....	22
<b>2 LES STRATEGIES CORRECTIVES</b> .....	<b>24</b>
2.1 REPARATION AU NIVEAU DU GENE .....	24
2.1.1 L'altération ciblée de gène .....	24
2.1.2 L'édition de gène .....	25
2.1.2.1 Principe et résultats obtenus .....	25
2.1.2.2 Utilisation des Zinc Finger Nucléases et des Méganucléases .....	27
2.1.2.2.1 Principe d'utilisation des Zinc Finger Nucléases .....	27
2.1.2.2.2 Utilisation des Zinc Finger Nucléases .....	28
2.1.2.2.3 Limites et enjeux actuels de l'utilisation des Zinc Finger Nucléases .....	30
2.1.2.2.4 Les Méganucléases.....	30
2.2 REPARATION DE L'ARN.....	31
2.2.1 Stratégies générales.....	31
2.2.2 L'épissage.....	33
2.2.2.1 À propos de maturation d'ARN.....	33
2.2.2.2 Mécanisme d'épissage des introns de type GT-AT .....	34
2.2.2.2.1 Les sites consensus d'épissage.....	34
2.2.2.2.2 La réaction d'épissage.....	35
2.2.2.2.3 Le spliceosome, composition et formation.....	36
2.2.2.2.4 Le cas du snRNA U7.....	39
2.2.2.2.5 Définition d'exon .....	41
2.2.2.2.5.1 Par la prise de structures secondaires.....	42
2.2.2.2.5.2 Par le recrutement de modulateurs de l'épissage .....	43
2.2.2.2.5.2.1 Les protéines SR.....	43
2.2.2.2.5.2.2 Les protéines hnRNP : .....	44
2.2.2.2.5.2.3 Les facteurs non-SR et non-hnRNP : .....	45
2.2.2.2.5.3 Le cas des exons terminaux .....	46
2.2.3 Les manipulations de l'épissage .....	48
2.2.3.1 Exclusion d'exon.....	49
2.2.3.2 Inclusion d'exons .....	53
2.2.3.2.1 Principe et modèle d'étude.....	53
2.2.3.2.2 Les ARN bifonctionnels.....	56
2.2.3.2.3 Utilisation d'oligonucléotides antisens sans queue SR.....	59
2.2.3.2.4 Blocage de l'inclusion de l'exon suivant.....	60
2.2.3.3 Le trans-épissage .....	60
2.2.3.3.1 Le trans-épissage naturel.....	61
2.2.3.3.2 Le trans-épissage, outil de thérapie génique.....	62
2.2.3.3.2.1 Structure des PTM .....	62
2.2.3.3.2.2 Résultats obtenus dans la littérature .....	64
2.2.3.3.2.3 Principe de la réaction de trans-épissage.....	66
2.2.3.3.2.4 Implication du spliceosome et de sa liaison aux sites d'épissage du PTM.....	66
2.2.3.3.2.5 Liaison du spliceosome sur la cible à reprogrammer .....	68
2.2.3.3.2.6 Les domaines liaisons, l'efficacité et la spécificité de la réaction .....	69
2.2.3.3.2.6.1 La longueur du domaine de liaison .....	69

2.2.3.3.2.6.2	La structure secondaire du domaine de liaison .....	70
2.2.3.3.2.6.3	Présence ou absence d'une queue polyadénylée ? .....	72
<b>3</b>	<b>LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE.....</b>	<b>73</b>
3.1	LA SUPER FAMILLE DES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE.....	74
3.2	GLYCOSAMINOGLYCANES ET MUCOPOLYSACCHARIDOSES.....	76
3.3	LA MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE VII.....	79
3.3.1	<i>Pathologie</i> .....	79
3.3.1.1	Généralités.....	79
3.3.1.2	Symptômes .....	79
3.3.1.3	Lien de cause à effet entre le défaut d'activité enzymatique et les symptômes cliniques.....	80
3.3.1.3.1	Cause architecturale .....	80
3.3.1.3.2	Augmentation secondaire de protéines lysosomales et non lysosomales .....	81
3.3.1.4	La $\beta$ -glucuronidase.....	82
3.3.1.4.1	Généralités .....	82
3.3.1.4.2	Transcription – Maturation.....	82
3.3.1.4.3	Traduction - Maturation – Adressage.....	83
3.3.2	<i>Les Modèles animaux de la MPS VII</i> .....	85
3.3.2.1	Le modèle canin .....	85
3.3.2.2	Le modèle murin .....	86
3.3.2.3	Le modèle félin.....	87
3.3.3	<i>Approches thérapeutiques</i> .....	88
<b>4</b>	<b>LE TRANS-EPISSAGE DANS LE MODELE CANIN DE LA MPS VII.....</b>	<b>90</b>
4.1	CONSTRUCTION DES PTM.....	90
4.2	UTILISATION DU SNRNA U7 .....	91
4.3	UTILISATION DES ARN BIFONCTIONNELS.....	91
	<b><u>RÉSULTATS</u></b> .....	<b>93</b>
	<b>IN VITRO EVALUATION OF TRANS-SPLICING IN THE CANINE MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE VII MODEL.....</b>	<b>94</b>
	<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	<b>109</b>
<b>1</b>	<b><u>PROFILS DE TRANS-EPISSAGE OBTENUS DANS L'ENVIRONNEMENT MINIGENE</u></b> .....	<b>112</b>
1.1	AU NIVEAU MOLECULAIRE .....	112
1.2	AU NIVEAU PROTEIQUE .....	117
1.2.1	<i>Présence du Tag 3xFlag</i> .....	117
1.2.2	<i>Homotétramérisation de la <math>\beta</math>-glucuronidase</i> .....	117
<b>2</b>	<b><u>PROFILS DE TRANS-EPISSAGE OBTENUS DANS L'ENVIRONNEMENT ENDOGENE</u></b> .....	<b>119</b>
2.1	DIFFERENCE D'ACTION ENTRE LES ENVIRONNEMENTS MINIGENE ET ENDOGENE .....	119
2.2	PROBLEME D'EFFICACITE DES PTM .....	121
2.2.1	<i>Problème de spécificité des PTM ?</i> .....	121
2.2.2	<i>Compétition cis versus trans-épissage ?</i> .....	123
2.2.3	<i>Absence d'ISE ou d'ESE dans les PTM ?</i> .....	123
2.2.4	<i>Présence d'un ESS dans la zone dégénérée ?</i> .....	126
2.2.5	<i>Présence de structures secondaires ?</i> .....	126
2.2.6	<i>Problème de localisation des PTM ?</i> .....	127
<b>3</b>	<b><u>STRATEGIES TESTEES POUR AUGMENTER L'EFFICACITE DE TRANS-EPISSAGE</u></b> .....	<b>128</b>
3.1	UTILISATION DU SNRNA U7 .....	128
3.2	UTILISATION DES ARN BIFONCTIONNELS.....	131
3.3	AUTRES METHODES POUR AUGMENTER L'EFFICACITE DE REACTION .....	133
	<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b> .....	<b>135</b>
	<b><u>RÉFÉRENCES</u></b> .....	<b>138</b>

## LISTE DES FIGURES :

Figure 1: Les stratégies de réparation de l'ADN	26
Figure 2: Les stratégies de réparation de l'ARN	32
Figure 3: Séquences consensus des sites d'épissage	35
Figure 4: L'épissage d'un ARN pré-messager nucléaire, un processus qui fait intervenir deux réactions de trans-estérification.	36
Figure 5: La reconnaissance des signaux d'épissage par le spliceosome son implication dans l'épissage.	38
Figure 6: Le snRNA U7 et ses modifications.	40
Figure 7: Exemples de l'impact des structures secondaires sur la reconnaissance des exons.	42
Figure 8: Exemple de définition d'exon par le recrutement de protéines activatrices ou inhibitrices de l'épissage.	48
Figure 9: les applications du saut d'exon	50
Figure 10: Le défaut d'inclusion de l'exon 7 de smn2.	55
Figure 11: L'inclusion d'exon à l'aide d'oligonucléotides.	57
Figure 12: Les réactions de trans-épissage et l'architecture des PTM	63
Figure 13: Les réactions de trans-épissage à l'aide des PTM 5' et 3'	67
Figure 14: Distribution des longueurs des domaines de liaison utilisés dans les précédentes études	70
Figure 15: La boucle de sécurité.	72
Figure 16: Le système endosomal-lysosomal.	74
Figure 17: Les principales causes des maladies de surcharge lysosomale.	75
Figure 18: GAG et MPS associées.	78
Figure 19: Maturation et adressage des hydrolases lysosomales.	84
Figure 20: Les réactions de trans-épissage et l'architecture des PTM	112
Figure 21: Profils de trans-épissage obtenus dans l'environnement minigène GusB canin	115
Figure 22: Profils de trans-épissage obtenus dans l'environnement minigène Lac Z	116
Figure 23: Illustration des différentes possibilités d'arrangements des sous-unités reprogrammées et des sous-unités mutées.	118
Figure 24: Explication des différences de profils de trans-épissages obtenus dans les systèmes minigène et endogène.	120
Figure 25: Le problème de définition d'exon des PTM.	125
Figure 26: Rétention ou clivage du snRNA U7 à l'issue de la réaction de trans-épissage	130
Figure 27: Structure secondaire des ARN bifonctionnels	132

## LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Les groupes de vecteurs viraux et leurs caractéristiques générales. ....	12
Tableau 2 : Choix des sérotypes d'AAV selon le tissu à cibler. ....	13
Tableau 3 : Exemples d'utilisation des ZFN. ....	29
Tableau 4 : Exemples de protéines SR et hnRNP. ....	46
Tableau 5 : Résumé des applications du saut d'exon. ....	51
Tableau 6 : Bilan de l'utilisation des ARN bifonctionnels dans le modèle SMA. ....	58
Tableau 7 : Composition des principaux GAG. ....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS:

<i>3'ss</i>	3' splice site	<i>ISE</i>	Intronic Splicing Enhancer
<i>5'ss</i>	5' splice site	<i>ISS</i>	Intronic Splicing Silencer
<i>AAV</i>	Adeno-Associated Virus	<i>KS</i>	Kératine Sulfate
<i>AAVr</i>	Adeno-Associated Virus recombinant	<i>Lac Z</i>	$\beta$ -galactosidase
<i>ADL</i>	Adrénoleucodystrophie	<i>LMNA</i>	Lamine A
<i>ADN</i>	Acide Désoxyribonucléique	<i>LMO2</i>	LIM domain Only 2
<i>afRPE</i>	Retinal Pigment Epithelium	<i>LSD</i>	Lysosomal Storage Disease
<i>APOB</i>	Apolipoprotein B	<i>Lsm10/11</i>	U7 snRNP-specific Sm-like protein
<i>ARN</i>	Acide Ribonucléique	<i>LTR</i>	Long Terminal Repeat
<i>ARNm</i>	ARN messenger	<i>M6P</i>	Mannose-6-Phosphate
<i>ARNt</i>	ARN de transfert	<i>M6PR</i>	Intronic Splicing Receptor
<i>ASF/SF2</i>	Auxiliary Splicing Factor/Splicing Factor 2	<i>Mdx</i>	X-linked Muscular dystrophy
<i>ATM (gène)</i>	Ataxia Telangiectasia Mutated	<i>miRNA</i>	micro RNA
<i>ATM (molécule)</i>	Artificial Trans-splicing Molecule	<i>MLV</i>	Murine Leukemia Virus
<i>Bcl</i>	B-cell CLL/lymphoma	<i>MPS</i>	Mucopolysaccharidose
<i>BD</i>	Binding Domain	<i>MyD88</i>	Myeloid differentiation primary response gene (88)
<i>Bif-BD</i>	Bifunctional Binding Domain	<i>NHEJ</i>	Non-Homologous End Joining
<i>BPS</i>	Branch Point Site	<i>NMD</i>	Nonsense Mediated Decay
<i>CBC</i>	Cap-Binding Complex	<i>Nova</i>	Neuro-oncological ventral antigen
<i>CCR5</i>	CC Chemokine Receptor 5	<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>CD4</i>	Cluster de Différenciation 4	<i>PGK</i>	Phosphoglycérate Kinase
<i>CD-MPR</i>	Cation-Dependent Mannose Phosphopate Receptor	<i>PolyA</i>	Polyadénylée
<i>cDNA</i>	Complementary DNA	<i>PPT</i>	Polypyrimidine Tract
<i>CFTR</i>	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator	<i>Protéines SR</i>	Protéines de type Sérine Arginine
<i>CI-MPR</i>	Cation-Independent Mannose Phosphopate Receptor	<i>PTB</i>	Polypyrimidine Tract-Binding
<i>CMV</i>	Cytomégalo virus	<i>PTM</i>	Pre Trans-splicing Molecule
<i>COL7A1</i>	Collagen de type VII, Alpha 1	<i>RACE-PCR</i>	Rapid Amplification of cDNA End PCR
<i>CS</i>	Chondroïtine Sulfate	<i>RE(R)</i>	Réticulum Endoplasmique (Rugueux)
<i>DHFR</i>	Di-Hydrofolate Reductase	<i>RNAi</i>	RNA interférence
<i>DMD</i>	Duchenne Muscular Dystrophy	<i>RNase</i>	Ribonucléases
<i>DMPK</i>	Dystrophia Myotonica Protein Kinase	<i>RSV</i>	Rous Sarcoma Virus
<i>Domaine RBD</i>	RNA Binding Domain	<i>RT-PCR</i>	Reverse Transcribed-PCR
<i>Domaine RRM</i>	RNA Recognition Motif	<i>SC35</i>	Splicing factor C35
<i>Domaine SR</i>	Sérine-Arginine	<i>SF1</i>	Splicing Factor 1
<i>DS</i>	Dermatane Sulfate	<i>shRNA</i>	short hairpin RNA
<i>DT-A</i>	Diphtheria Toxine subunit A	<i>SIN</i>	Self Inactivated
<i>EGF</i>	Endothelial Growth Factor	<i>siRNA</i>	Short interfering RNA
<i>ES (Cellules)</i>	Embryonic Stem Cells ou Cellules souches Embryonnaires	<i>SIV</i>	Simian Immunodeficiency Virus
<i>ESE</i>	Exonic Splicing Enhancer	<i>SLBP</i>	Stem-Loop Binding Protein
<i>ESS</i>	Exonic Splicing Silencer	<i>Sm</i>	Small nuclear ribonucleoprotein
<i>FGF</i>	Fibroblast Growth Factor	<i>SMA</i>	Spinal Muscular Atrophy
<i>FIV</i>	Feline Immunodeficiency Virus	<i>SMN</i>	Survival Motoneuron
<i>FoIH1</i>	Folate Hydrolase 1	<i>SmOpt</i>	Small nuclear ribonucleoprotein Optimised
<i>GAG</i>	Glycoaminoglycane	<i>snRNA</i>	small nuclear RNA
<i>GFP</i>	Green Fluorescent Protein	<i>snRNP</i>	small nuclear Ribonucleoprotein
<i>GM2/3</i>	Ganglioside M2/3	<i>SRm</i>	Serine/arginine-rich splicing factor-related nuclear matrix protein
<i>GPRI43</i>	G Protein-coupled Receptor 143	<i><math>\beta</math>HCG6</i>	$\beta$ subunit of human Chorionic Gonadotropin gene 6
<i>GUSB</i>	$\beta$ -Glucuronidase	<i>STS</i>	Segmental Trans-Splicing
<i>HDAC</i>	Histone déacétylase	<i>SV40</i>	Simian Virus 40
<i>HDE</i>	Histone Downstream Element	<i>Tau</i>	Microtubule-Associated Protein Tau
<i>HDR</i>	Homology Directed Repair	<i>TetR-KRAB</i>	Kruppel Associated Box
<i>HIV</i>	Human Immunodeficiency Virus	<i>TGA</i>	Targeted Gene Alteration
<i>hnRNP</i>	Heterogeneous Ribonucleoprotein Particles	<i>Tia-1</i>	T-cell-restricted intracellular antigens
<i>HoxB13</i>	Protéine à Homéobox de type 13	<i>Tnt</i>	Gène de la Titine
<i>HS</i>	Héparane Sulfate	<i>U2AF</i>	snRNP U2 Auxiliary Factor
<i>HSV</i>	Herpes Simplex Virus	<i>VEGF</i>	Vascular Endothelial Growth Factor
<i>hTra2<math>\beta</math></i>	human Transformer-2-beta	<i>VSVG</i>	Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein
<i>IE</i>	Intra-Exonique	<i>SCID</i>	Severe Combined Immunodeficiency
<i>IL2<math>\gamma</math>R</i>	Interleukine 2 Gamma Receptor	<i>WT1</i>	Wilms tumor 1 homolog
		<i>ZFN</i>	Zinc Finger Nuclease

# **INTRODUCTION**

La thérapie génique consiste à apporter du matériel génétique thérapeutique dans une cellule, un tissu, ou un organe. Dans un premier temps, elle a consisté à apporter une copie fonctionnelle, sous sa forme cDNA, d'un gène muté. C'est ce qu'on appelle la thérapie substitutive ou transfert de gène. Bien que toujours largement étudiée, restreindre aujourd'hui

la thérapie génique à cette seule version substitutive serait incomplet. En effet, les avancées de la science en matière de génétique, dans la compréhension de phénomènes comme la réparation du génome, la maturation des ARN messagers ou encore les régulations post-transcriptionnelles ont permis l'émergence de nouvelles stratégies basées sur la recombinaison homologue, les modulations de l'épissage ou encore la destruction d'ARN messagers. Dans ces stratégies, on ne cherche plus à substituer la carence génétique, mais à la corriger. La communauté scientifique a ainsi vu arriver de nouvelles stratégies telles que l'altération ciblée et l'édition de gènes, le saut et l'inclusion d'exon, le *trans*-épissage ou encore l'ARN interférence. On parle alors de thérapie génique réparatrice ou corrective.

De plus, la thérapie génique, qui n'avait à l'origine pour but que de s'intéresser aux maladies génétiques héréditaires monogéniques est aujourd'hui devenue une possibilité de s'attaquer à certaines maladies acquises telles que les maladies infectieuses, cardiovasculaires, neurodégénératives ou encore les cancers. À titre d'exemple, le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), la maladie de Parkinson sont aujourd'hui des cibles de la thérapie génique, utilisant les voies d'ARN interférence pour restreindre le développement du VIH (Rossi et al., 2007), des facteurs de croissance ou neuroprotecteurs pour ralentir le développement parkinsonien (Kirik et al., 2004; Tuszynski, 2002), ou encore des facteurs pro-apoptotiques, anti-angiogéniques, des si/shRNA et bien d'autres pour lutter contre les cancers (Lo et al., 2005; Pai et al., 2006; Persano et al., 2007).

Ce manuscrit établit le compte-rendu d'une étude visant à étudier la faisabilité du *trans*-épissage dans un modèle complexe de thérapie génique, le modèle canin de la mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII).

Avant de détailler le *trans*-épissage et son modèle d'étude, nous allons nous intéresser aux possibilités données par le transfert de gène, puis nous verrons comment les thérapies correctives peuvent apporter des solutions aux contraintes et aux limites de ce dernier.

## ***1 La thérapie génique par transfert de gène***

---

L'objectif du transfert de gène dans les maladies innées est de suppléer une carence génétique par l'apport de la copie fonctionnelle du gène en cause dans une cellule, un tissu ou un organe entier dans le but de corriger ou ralentir la progression d'une maladie. Dans le cas des maladies acquises, d'autres objectifs existent : empêcher ou provoquer la mort cellulaire par exemple, mais sans pour autant suppléer une carence génétique.

Le transfert de gène repose sur le développement de vecteurs permettant l'apport efficace et en toute sécurité d'un gène fonctionnel dans la cellule. Le transfert de gène peut s'effectuer *ex vivo* ou *in vivo*. Cela dépend du type cellulaire à transduire et du vecteur utilisé. *Ex vivo*, les cellules sont prélevées dans l'organisme, modifiées génétiquement avec un vecteur portant le gène thérapeutique, puis réintroduites chez le patient. *In vivo*, le gène thérapeutique est apporté directement dans l'organisme. Il existe deux catégories de vecteurs : viraux et non viraux. Les vecteurs non-viraux sont des lipides ou des polymères cationiques capables de se lier à l'ADN par interaction électrostatique. Ils pénètrent dans la cellule en fusionnant avec la membrane plasmique (Eliyahu et al., 2005; Martin et al., 2005; Pack et al., 2005). Ils peuvent être produits en grande quantité et les réactions immunologiques liées à leur utilisation sont minimales (Lv et al., 2006). Cependant, l'expression du gène d'intérêt thérapeutique étant transitoire, le transfert de gène à l'aide de ces vecteurs reste peu efficace (Read et al., 2005). Les vecteurs viraux sont des virus recombinants. Afin d'être utilisé comme vecteur, le virus est délété d'une partie ou de la totalité de son génome, le rendant non-pathogène et défectif pour la réplication. Le génome viral est ensuite remplacé par le gène thérapeutique. Un grand nombre de vecteurs viraux a été testé, parmi lesquels des vecteurs dérivés des rétrovirus (oncorétrovirus et lentivirus), des adénovirus, des virus adéno-associés (AAV, pour *Adeno Associated Virus*), ou du virus de l'herpès (HSV pour *Herpes Simplex Virus*). Dans chacune de ces grandes familles de vecteurs, plusieurs membres peuvent être comptés. Ainsi, issus de la famille des rétrovirus, les vecteurs oncorétroviraux peuvent être issus de différents virus, parmi lesquels le MLV (*Murine Leukemia Virus*) ou bien le RSV (*Rous Sarcoma Virus*) et les vecteurs lentiviraux peuvent être issus du HIV, SIV, FIV (respectivement virus de l'immunodéficience Humaine, Simienne ou Féline) (Verma and Weitzman, 2005).

Le tropisme cellulaire, la taille du génome encapsidé et l'immunogénicité dépendent du virus utilisé (**Tableau 1**).

## ***1.1 Choix du vecteur***

### ***1.1.1 En fonction de son tropisme***

Un élément extrêmement important dans le choix du vecteur est son tropisme. En effet, tous les vecteurs ne transduisent pas tous les types cellulaires avec la même efficacité. De plus, au sein même d'un type de vecteur, différents sérotypes n'auront pas la même efficacité de transduction. Concernant le tropisme des grandes familles de vecteurs, il apparaît que certains ont un tropisme large (vecteurs lentiviraux, rétroviraux, adénoviraux), d'autres plus limités (les vecteurs herpétiques) (**tableau 1**) (Thomas et al., 2003; Verma and Weitzman, 2005). Différents sérotypes peuvent être utilisés, arborant des tropismes variables, à l'image des vecteurs adénoviraux, sérotypés avec les capsides 2, 4, 5 ou 7. Concernant les vecteurs rétroviraux et lentiviraux, leur tropisme dépend du choix des protéines d'enveloppe, issues de rétrovirus (enveloppe amphotrope) ou bien de protéines d'enveloppe provenant d'autres virus, à l'instar de l'enveloppe VSVG (*Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein*).

Concernant l'AAV, son caractère non-pathogène à l'état sauvage lui conférant une qualité supplémentaire d'un point de vue sanitaire par rapport aux autres vecteurs viraux, les liens entre sérotype et tropisme ont été très étudiés. D'une façon générale, le tropisme varie en fonction du sérotype (**tableau 2**): douze sérotypes d'AAV sont aujourd'hui connus et arborent des tropismes différents (Wu et al., 2006). De plus, des vecteurs AAV « chimériques » et « mosaïques » ont été créés, et permettent l'émergence de vecteurs dotés d'un tropisme différent (Choi et al., 2005). Les vecteurs chimériques sont des vecteurs porteurs de protéines de capsid de l'AAV et de protéines exogènes. Les vecteurs mosaïques sont des vecteurs porteurs de protéines de capsides issues plusieurs sérotype d'AAV.

L'attention devra donc être mise sur la capacité du vecteur choisi à transduire les cellules souhaitées. Par exemple, travailler sur le système nerveux central sera possible avec

les vecteurs lentiviraux, herpétiques, adénoviraux, et les AAVr de sérotypes 1, 4, 5, 7 et 8. Cependant, si la cible est hépatique, les vecteurs herpétiques seront moins efficaces, et les sérotypes d'AAVr 8 et 9 seront plus facilement choisis pour obtenir une expression efficace du transgène. Il résulte de ces données un tableau d'utilisation des vecteurs viraux (**tableau 1**), évoluant constamment par l'accumulation de données quant à leur création, leur modification et leur test dans de nouveaux modèles animaux.

Vecteur	Capacité d'encapsidation	Capacité de transduction	Immunogénicité	Génome vectoriel	Avantages principaux	Limites principales	
<b><i>Enveloppés</i></b>							
<b>Vecteurs rétroviraux</b>	Oncorétrovirus	8 kb	Cellules en division	Faible	Intégré	Transfert de gène persistant dans les cellules en division	Ne transduit que les cellules en division; intégration peut induire une oncogenèse dans certaines applications
	Lentivirus	8 kb	Large	Faible	Intégré	Transfert de gène persistant dans les cellules en division	Intégration peut induire une oncogenèse dans certaines applications
	HSV-1	40 kb <sup>1</sup> ; 150 kb <sup>3</sup>	Cellules neuronales	Forte	Épisomal	Haute capacité d'encapsidation; Fort tropisme pour les neurones	Immunogène; Expression transitoire dans les cellules autres que les neurones
<b><i>Non-enveloppés</i></b>							
	Adénovirus	8 kb <sup>1</sup> ; 30 kb <sup>2</sup>	Large	Forte	Épisomal	Très efficace pour transduire un grand nombre de tissus	Immunogène
	AAV	4,7 kb	Large, varie avec les sérotypes	Faible	Épisomal	Peu immunogène; Non pathogénique	Faible capacité d'encapsidation

**Tableau 1 : Les groupes de vecteurs viraux et leurs caractéristiques générales.**

*Adapté de (Thomas et al., 2003).* 1 : déficient pour la réplication, 2 : auxiliaire dépendant, 3 : amplicon.

### 1.1.2 En fonction de son maintien dans la cellule cible

Certains vecteurs viraux permettent une intégration du gène d'intérêt thérapeutique dans le génome de la cellule hôte. C'est le cas pour les vecteurs rétroviraux et lentiviraux. D'autres, bien que permettant une expression à long terme de la protéine d'intérêt, sont caractérisés par un maintien extrachromatinien de leur matériel génétique, comme les vecteurs adénoviraux et herpétiques (Verma and Weitzman, 2005) (**tableau 1**). Concernant l'AAV sauvage, un site d'intégration a été mis en évidence *in vitro*, le site AAV S1 (Kotin et al., 1992; Linden et al., 1996; Philpott et al., 2002). Cependant, les choses semblent être plus

compliquées pour les AAV recombinants, d'autant plus *in vivo*. En effet, l'intégration des vecteurs AAV à lieu de façon aléatoire *in vitro* (Smith, 2008). De plus, bien que des évènements d'intégration aient été décrits *in vivo*, en particulier dans des cellules en prolifération (cellules hépatiques) (Inagaki et al., 2008 ; Miao et al., 1998; Schultz and Chamberlain, 2008), il apparaît que dans d'autres organes (muscle squelettique), l'intégration reste extrêmement limitée (Penaud-Budloo et al., 2008; Schnepp et al., 2003). Quoiqu'il en soit, le taux d'intégration du génome AAVr *in vivo* est incomparable à celui des vecteurs rétroviraux et lentiviraux.

Par conséquent, le choix du vecteur viral sera aussi fait en fonction de l'aspect intégré *versus* extrachromosomique du génome vectoriel. En effet, si le transfert de gène se fait *in vivo* et que les cellules à cibler sont proliférantes (cellules du système hématopoïétique), alors un vecteur intégratif sera choisi, alors que dans le cas de transfert *in vivo* dans un organe non-proliférant (rétine, système nerveux central, muscle *etc.*), d'autres vecteurs, tels que les vecteurs AAV, pourront être utilisés.

Tissus	Sérotypes d'AAVr optimaux
Foie	8 - 9
Poumons	5 - 6 - 9
Pancréas	1 - 8 - 9
Rein	2 - 9
Muscle squelettique	1 - 6 - 7 - 8 - 9
Cœur	8
Système nerveux central	1 - 4 - 5 - 7 - 8
Réticulum pigmentaire rétinien	1 - 4 - 5 - 7 - 8 - 9
Photorécepteurs de la rétine	5 - 7 - 8

***Tableau 2 : Choix des sérotypes d'AAV selon le tissu à cibler.  
D'après (Schultz and Chamberlain, 2008; Wu et al., 2006).***

### 1.1.3 En fonction de son immunogénicité

Enfin, le choix du vecteur se fera en fonction de son utilisation. Travailler sur les cancers ou les maladies génétiques innées n'a pas le même but. En l'occurrence, le transfert de gène dans les maladies génétiques innées demande une expression à long terme du transgène, incompatible avec l'apparition d'une réponse immunitaire contre la cellule transduite, causée par le vecteur utilisé. Les stratégies anticancéreuses quant à elles visent une expression à court terme du transgène, notamment de molécules pro-apoptotiques, antiangiogéniques voir toxiques. Se servir de l'immunogénicité du vecteur devient donc un atout dans ce cadre (**tableau 1**). Les vecteurs adénoviraux sont donc par exemple très utilisés dans les stratégies anticancéreuses, moins dans le cadre de maladies innées.

## **1.2 Construction de la cassette d'expression**

Au même titre, la cassette d'expression insérée dans le vecteur varie en fonction de la maladie, mais aussi en fonction de la stratégie adoptée. Ainsi, il est possible non seulement d'apporter dans les cellules malades le cDNA correspondant au gène défectueux, mais aussi un cDNA codant une protéine neuroprotectrice, anti-angiogénique, pro-apoptotique, anti-inflammatoire ou toxique par exemple. Tout dépend de l'effet souhaité. Dans le cas des maladies génétiques innées pour lesquelles le gène en cause a été identifié, il est de mise d'apporter son équivalent cDNA. Cependant, dans le cas des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou des cancers, les autres approches peuvent être bénéfiques.

Le cDNA sera mis sous contrôle d'un promoteur qui, lui aussi, peut varier en fonction des modèles. Il peut être souhaitable de contrôler le niveau d'expression de la protéine d'intérêt dans le temps, de même que sa biodistribution. Des promoteurs inductibles par des drogues ou tissus-spécifiques pourront être choisis, à l'instar du système inductible à la tétracycline (Chenuaud et al., 2004b; Stieger et al., 2006; Stieger et al., 2007) ou des promoteurs desmine dans le muscle,  $\alpha$ -antitrypsine dans le foie ou encore rhodopsine kinase dans les photorécepteurs de l'œil (Al-Dosari et al., 2006; Chenuaud et al., 2004b; Khani et al., 2007; Pacak et al., 2008; Ponder et al., 2002). Il peut par contre être souhaitable de voir un profil d'expression large en termes de biodistribution et de quantité de protéines produites. Un

promoteur ubiquiste ou viral sera alors de mise, comme les promoteurs  $\beta$ -actine, phosphoglycérate kinase (PGK) ou CMV (promoteur très précoce du Cytomégalo virus) (Kosuga et al., 2000; Miyagi et al., 2008; Moullier et al., 1993a).

### **1.3 Choix de la voie d'injection**

De même, le choix de la voie d'injection (intracérébrale, intraveineuse, intramusculaire, intratumorale, *etc*) aura son importance. Il permettra de toucher l'organe dans lequel l'expression du transgène sera la plus bénéfique. Associée au choix du vecteur et du promoteur, la voie d'injection permettra de toucher un nombre de cellules suffisant pour modifier le phénotype, avant la mise en place de lésions irréversibles causées par la maladie, et tout en engendrant le moins d'effets secondaires possibles. De plus, dans le cas d'expression d'une protéine sécrétée, des organes peuvent être utilisés comme site ectopique de production du transgène (le foie, le muscle *etc*) (Chenuaud et al., 2004b).

### **1.4 Problèmes liés au transfert de gène dans les maladies génétiques monogéniques**

#### **1.4.1 Oncogénèse**

Révéler suite à la description de cas de leucémie après transfert de gène *ex vivo* chez des enfants atteints de déficience immunitaire combinée sévère liée au chromosome X (X-SCID) (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Schmidt et al., 2005), le potentiel oncogénique des vecteurs intégratifs a par la suite beaucoup fait parler de lui. En effet, il était jusqu'alors pensé que les vecteurs rétroviraux intégraient leur génome au hasard dans le génome de la cellule hôte (Verma and Weitzman, 2005). Plus exactement, l'absence de consensus dans les profils d'intégrations génomiques a longtemps laissé penser que l'insertion du génome vectoriel à proximité de gènes régulateurs du cycle cellulaire, même si elle pouvait avoir lieu, ne représentait qu'un risque minime (Cornetta et al., 1992). Le potentiel oncogénique des vecteurs oncorétroviraux et lentiviraux a donc longtemps été

sous-évalué. L'apparition de leucémies, chez les sujets les plus jeunes de l'essai clinique mené par Alain Fisher, a eu pour conséquence la prise de conscience par la communauté scientifique et les instances réglementaires des risques de transformation tumorales. En effet, il a pu être démontré que si les vecteurs rétroviraux intègrent leur contenu au hasard dans le génome hôte, ils le font dans des sites de chromatine ouverts et/ou fragiles (Abel et al., 2007; Bester et al., 2006; Deichmann et al., 2007; Mitchell et al., 2004; Schroder et al., 2002). Ces sites correspondant à des gènes actifs, il arrive que l'intégration se fasse à l'intérieur ou aux alentours de gènes régulateurs du cycle cellulaire, à l'instar du gène LMO2 dans les lignées hématopoiétiques des enfants atteints d'immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X (Hacein-Bey-Abina et al., 2003b; McCormack and Rabbitts, 2004). Cependant, le profil d'insertion dépendra du modèle étudié, puisqu'en fonction du stade de blocage dans le processus différenciation, les mêmes gènes ne seront pas exprimés de la même façon, modifiant i) l'accessibilité de la chromatine au génome vectoriel et donc ii) son profil d'intégration. Cela dit, d'une façon générale, la perte d'activité d'un gène suppresseur de tumeur ou au contraire la surexpression d'un proto-oncogène peut alors avoir comme conséquence la transformation tumorale de la cellule.

La première solution apportée à ce problème a été le développement de vecteurs rétroviraux (Dougherty and Temin, 1987; Hawley et al., 1987; Yee et al., 1987; Yu et al., 1986) et lentiviraux SIN (*Self Inactivated*) (Zufferey et al., 1998). Ces vecteurs sont délétés de la région U3 présente dans le LTR 3', dupliqué en 5' durant l'étape de transcription inverse du génome vectoriel. La région U3 portant les activateurs de transcription naturels du virus, leur délétion permet de diminuer l'activation de proto-oncogènes aux alentours de la zone d'intégration du génome vectoriel, sans gêner l'expression du transgène, placé sous contrôle d'un promoteur interne. L'attention devra cependant être mise sur la capacité du promoteur interne à activer lui-même les promoteurs adjacents.

De plus, le développement de vecteurs rétroviraux et lentiviraux déficients pour l'intégration a permis de s'affranchir de tous les problèmes d'activation de proto-oncogènes et d'intégration au sein même de séquences codantes (Philpott and Thrasher, 2007). Cependant, si la génération de tels vecteurs permettait de lever un problème, elle n'était pas une solution

en soi puisque ces vecteurs n'étaient plus, en l'état, aptes à servir dans les protocoles de transfert de gène *ex vivo*. Leur utilité s'est révélée récemment. En combinant la perte de pouvoir intégratif de ces vecteurs à l'utilisation des zinc finger nucléases ou des méganucléases, il est désormais possible d'intégrer une cassette d'expression dans un locus choisi du génome (voir **chapitre 2.1.2.2** pour plus d'informations).

#### 1.4.2 Taille d'encapsulation des vecteurs viraux

Une autre limite du transfert de gène à l'aide de vecteurs viraux est la taille limitée du matériel transportable. Même si les vecteurs adénoviraux et herpétiques donnent la possibilité de vectoriser 30 kb et 150 kb respectivement, leur utilisation dans des protocoles de transfert de gène dans les maladies monogénique est compromise par leur immunogénicité. Les vecteurs oncorétroviraux, lentiviraux et AAV sont donc les vecteurs les plus souvent utilisés dans ce cadre. Malheureusement, leur capacité d'encapsulation est limitée (**tableau 1**), particulièrement pour les vecteurs AAV. L'exemple le plus classique est celui de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Le gène responsable de la maladie, la dystrophine, arbore un cDNA musculaire de 14 kb (Blankinship et al., 2006), incompatible avec les vectorisations en vecteur AAV, rétroviral ou lentiviral (**tableau 1**).

Pour contrer ce problème, trois solutions ont été apportées. La première profite de la structure particulière de certaines protéines pouvant être raccourcies tout en conservant une activité protéique. Ainsi, la protéine dystrophine est composée de domaines N et C terminaux indispensables à l'activité protéique puisqu'ils permettent la liaison aux protéines du cytosquelette, mais d'un domaine central composé de répétitions *spectrin-like*, pouvant être raccourci sans compromettre la liaison de la protéine aux composants du cytosquelette. Une délétion de plusieurs kilobases est donc possible dans le domaine central du cDNA de la dystrophine, générant une mini- ou micro-dystrophine permettant son encapsulation dans différents types de vecteurs viraux (Athanasopoulos et al., 2004; Bostick et al., 2008;

Gregorevic et al., 2006; Gregorevic et al., 2004; Harper et al., 2002; Li et al., 2005; Liu et al., 2005a; Wang et al., 2000; Watchko et al., 2002).

Une autre stratégie vise à découper le cDNA et à le vectoriser dans 2 particules d'AAVr différentes, permettant le transfert de 10kb par vectorisation AAV (Nakai et al., 2000; Sun et al., 2000; Yan et al., 2000). Dans cette stratégie, la partie 5' du cDNA sera porteuse d'un site donneur d'épissage, alors que la partie 3' sera porteuse d'un site accepteur de l'épissage. Par conséquent, un épissage entre ces 2 morceaux de cDNA sera possible, si la conformation prise par les concatémères vectoriels est de type « tête à queue ». Cette stratégie a été utilisée pour faire exprimer le facteur VIII (hémophilie A), gène de 7 kb, dans un modèle de souris immunodéficiente (Chao et al., 2002), ainsi que la mini-dystrophine chez la souris mdx (Lai et al., 2006; Lai et al., 2005). Cependant, l'efficacité du système semble limitée par l'efficacité d'épissage elle-même (Lai et al., 2006; Lai et al., 2005).

Enfin, une équipe a récemment décrit la possibilité d'utilisation du « *trans*-épissage des protéines » comme outil thérapeutique (Li et al., 2008b). Cette méthode utilise un mécanisme existant chez les micro-organismes, mais jamais encore identifiés chez l'Homme. Chez *Cyanobacterium Synechocystis* par exemple, la protéine DnaE est codée par deux gènes différents. Les deux protéines résultantes sont munies d'un domaine « intein » capable d'une réaction de « *trans*-épissage » autocatalysée. En d'autres termes, les deux peptides sont capables de fusionner pour former une seule et même protéine. En ajoutant des domaines « intein » aux extrémités de deux morceaux d'ADN codant les parties N- et C-terminales de la mini-dystrophine, Li *et al.* ont montré la faisabilité du « *trans*-épissage » protéique *in vitro* et *in vivo* chez la souris mdx (Li et al., 2008b).

### 1.4.3 Contrôle du niveau et du site d'expression de la protéine

D'une façon générale, il est encore aujourd'hui difficile d'apprécier les conséquences de la surexpression prolongée d'une protéine dans un site ectopique de production, que ce soit au niveau cellulaire et tissulaire, ou au niveau de la réponse immunitaire que cette surexpression pourrait provoquer.

Il est même parfois nécessaire de contrôler le niveau et le site d'expression de la protéine d'intérêt. À titre d'exemple, c'est le cas pour le transfert de gène chez les patients diabétiques insulino-dépendants. Chez ces patients, l'expression de l'insuline n'est nécessaire qu'au moment des repas, permettant la prise en charge du glucose et son internalisation dans les cellules. Ici, l'expression de l'insuline à un niveau trop élevé pourrait conduire à une hypoglycémie chronique, à un état comateux voir même à la mort, en fonction du niveau d'expression. Contre ces problèmes de régulation de l'expression de l'insuline, certaines équipes ont mis en place des essais utilisant des promoteurs sensibles au glucose, pour réguler l'expression de la protéine au moment du repas (Samson and Chan, 2006; Yoon and Jun, 2002).

Plus globalement, l'existence des promoteurs inductibles par la rapamycine et les tétracyclines permet une régulation de l'expression en temps voulu (Chenuaud et al., 2004b; Rivera et al., 1996; Stieger et al., 2006; Stieger et al., 2007; Ye et al., 1999).

La mise en place d'un système de régulation à l'aide de miRNA permet elle aussi le contrôle du niveau et du site d'expression de la protéine d'intérêt (Brown et al., 2007a; Brown et al., 2007b). En l'occurrence, les auteurs se sont servis de miRNA déjà caractérisés, et ont ajouté leurs séquences de reconnaissance dans la cassette d'expression. La présence naturelle du miRNA dans les cellules dans lesquelles l'expression n'est pas souhaitée empêche alors la production de la protéine. Il est ainsi possible de permettre l'expression de facteur IX dans le foie mais de la bloquer dans les lignées hématopoïétiques (Brown et al., 2007a), de permettre l'expression de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans des cellules dendritiques immatures ou dans des cellules ES indifférenciées mais de la bloquer dans les cellules dendritiques

matures et dans les cellules ES différenciées, voir même de permettre l'expression d'un gène suicide dans une cellule tumorale et de la bloquer dans les cellules saines avoisinantes (Brown et al., 2007b).

Cependant, ces possibilités de régulation doivent encore prouver leur efficacité et leur innocuité à long terme. Elles doivent non seulement garantir l'arrêt d'expression en temps voulu, mais aussi leur sécurité, notamment sur le plan immunologique en ce qui concerne les promoteurs inductibles (Le Guiner et al., 2007).

#### 1.4.4 Remaniements épigénétiques de la cassette d'expression

Une autre contrainte du transfert de gène tient aux modifications épigénétiques subies *in vivo* par les cassettes d'expression. En effet, il existe un code, utilisé par la cellule, lui permettant naturellement de réguler l'expression de certains gènes au cours du développement ou d'inactiver un des deux chromosomes X chez la femme par exemple. Dans ce code, l'état de compaction de la chromatine est important, de même que son état de méthylation. L'état de compaction de la chromatine en euchromatine (relâchée) ou en hétérochromatine (compactée) passe par des modifications des histones, à l'instar de l'état d'acétylation des histones ou de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Une hypoacétylation et une méthylation des histones compacte la chromatine. De plus, la cellule utilise un deuxième moyen de contrôle transcriptionnel, se servant de l'état de méthylation des cytosines dans les doublets CG des îlots CpG (Newell-Price et al., 2000). Concrètement, un promoteur méthylé sur tous ses îlots CpG est inactif. De plus, il existe des liens entre méthylation de l'ADN et état de compaction de la chromatine. Les protéines MeCP<sub>2</sub> et MBD1 par exemple reconnaissent les îlots CpG méthylés et interagissent ensuite avec les complexes de déacétylation (Fujita et al., 2003; Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Les événements de méthylations de l'ADN provoquent donc la compaction de la chromatine et l'inactivation du gène d'intérêt.

Par conséquent, connaître l'état de compaction du génome vectoriel et l'état de méthylation de son promoteur dans les essais de transfert de gène est important. Concernant

les vecteurs intégratifs, il a déjà été montré qu'ils subissent des modifications épigénétiques aboutissant à une baisse voire à la perte de l'expression du transgène. Ces modifications sont en partie au moins dues aux séquences rétrovirales (ou lentivirales) présentes en *cis* sur le génome vectoriel, l'entraînant dans un état compacté, incompatible avec une activité transcriptionnelle (Ellis, 2005; Mok and Lever, 2007).

De plus, il a été montré que le transfert de gène *in vivo* à l'aide de vecteurs plasmidiques porteurs de séquences bactériennes résultait en un remaniement épigénétique du plasmide, ce qui pourrait en partie expliquer le caractère transitoire de l'expression à partir de ces vecteurs (Chen et al., 2004), même si les méthylations des îlots CpG bactériens n'ont que peu d'importance, et si l'état hétérochromatinien du plasmide est la cause majoritaire de l'inhibition *in vivo* (Chen et al., 2008b). L'utilisation de « minicircles » (plasmides sans séquences bactériennes) augmente le niveau et la durée d'expression du transgène *in vivo* (Chen et al., 2003; Chen et al., 2005). De plus, en comparant l'expression de luciférase à partir de vecteurs herpétiques produits classiquement (c'est-à-dire en présence de séquences bactériennes) ou à partir de minicircle (sans séquences bactériennes), il a été montré que les vecteurs herpétiques subissaient eux aussi des remaniements chromatinien au niveau des séquences bactériennes (Suzuki et al., 2006). Plus précisément, il est probable que les séquences bactériennes représentent un site de répression primaire, aboutissant à une compaction totale du génome vectoriel ou plasmidique.

Les questions de remaniement épigénétiques se posent donc pour tous les vecteurs viraux non intégratifs. Concernant l'AAVr notamment, le génome vectoriel est maintenu dans la cellule hôte sous forme épisomique certes, mais aussi dans un environnement « *chromatine like* ». En d'autres termes, le génome vectoriel AAV est associé à des histones (Penaud-Budloo et al., 2008). De plus, il a déjà été montré qu'un traitement aux inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) augmentait le niveau d'expression à partir de ces vecteurs, suggérant qu'ils subissent des remaniements chromatinien (Chen et al., 1997). Enfin, les vecteurs AAV encapsidant de façon non spécifique des séquences présentes sur le plasmide vecteur, il arrive que des séquences bactériennes soient encapsidées (Chadeuf et al., 2005). La question des remaniements des histones et des méthylations des séquences bactériennes

encapsidées par erreur et de l'impact qu'ils auront sur le profil d'expression du transgène est donc posée.

Plusieurs possibilités sont malgré tout offertes pour contrer les modifications épigénétiques subies par les génomes vectoriels. Premièrement, l'utilisation d'inhibiteurs des HDAC permet d'empêcher l'hypoacétylation des génomes vectoriels (Chen et al., 1997; Katz et al., 2007). Cependant, si ces molécules permettent de lever l'inhibition du génome vectoriel, elles permettent aussi de lever celle des gènes cellulaires. Leur utilisation à long terme doit donc avant tout prouver son innocuité *in vivo*. De plus, il a été montré que leur utilisation ne résolvait pas les compactations stabilisées *in vitro* (chromatine compactée depuis plusieurs semaines) (McInerney et al., 2000). Deuxièmement, il a été montré que la présence de séquences bactériennes dans les plasmides vectoriels agissait négativement sur l'expression des génomes vectoriels plasmidiques et herpétiques (Chen et al., 2003; Chen et al., 2005; Suzuki et al., 2006). L'utilisation généralisée de « minicircles » apportera peut-être une amélioration, notamment dans le cas de l'AAVr, capable d'encapsider des séquences bactériennes dans les particules virales. Troisièmement, la création de vecteurs rétroviraux et lentiviraux auto-inactivés (SIN), créés pour des raisons de sécurité sanitaires dans un premier temps, se révèle positive au regard des modifications épigénétiques. Il s'avère en effet que la région U3 est porteuse d'un certain nombre d'éléments inhibiteurs, et que son excision des génomes vectoriels permet de lever en partie les modifications épigénétiques (Ellis, 2005; Mohamedali et al., 2004).

#### 1.4.5 Réponses immunitaires

La mise en place de réponses immunitaires contre le vecteur viral et le transgène est elle aussi à prendre en considération. Concernant la réponse contre le vecteur, le degré d'immunogénicité du vecteur varie en fonction du virus recombinant. Certains vecteurs sont très immunogènes (les vecteurs adénoviraux et herpétiques), d'autres beaucoup moins (l'AAVr) (**tableau 1**) (Thomas et al., 2003). Cette faible immunogénicité serait en partie due au fait que les vecteurs AAV ne sont pas capables de transduire efficacement les cellules

présentatrices d'antigènes *in vivo*, ni de créer une réponse immunitaire innée ou inflammatoire importante, contrairement aux vecteurs adénoviraux (Jooss et al., 1998; Zaiss and Muruve, 2005). Cependant, un certain nombre d'études ont révélé l'apparition d'une réponse innée transitoire permettant l'apparition de réponses adaptatives dirigées contre la capsid e d'AAVr et contre le produit du transgène. Des réponses adaptatives humorales (présence d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid e et/ou le produit du transgène) mais aussi cellulaires (dirigées contre la capsid e et/ou le produit du transgène) ont été décrites. Les réponses cellulaires peuvent provoquer une destruction des cellules transduites et donc une perte de l'expression du transgène (Favre et al., 2002; Herzog et al., 2001; Manno et al., 2006).

Les réponses immunitaires dirigées contre le produit du transgène apparaîtront plus facilement si la mutation en cause provoque l'apparition d'un codon stop prématuré dans la protéine. En effet, dans ce cas, l'ARN messager sera détruit très rapidement par la voie NMD (pour *Nonsense Mediated Decay*). La protéine codée par ce gène sera donc absente de la cellule. Le système immunitaire, non éduqué pour reconnaître la protéine comme sienne, reconnaîtra alors les cellules l'exprimant comme étrangères, et les détruira. Cependant, si la présence d'un codon stop dans le gène muté favorise l'apparition d'une réponse immunitaire contre le produit du transgène, des réponses peuvent être détectées dans d'autres cas. À titre d'exemple, une réponse adaptative a été décrite chez des macaques exprimant, depuis le muscle, un gène de l'érythropoïétine homologue au gène endogène (Chenuaud et al., 2004a; Gao et al., 2004).

Il semble que la voie d'injection du vecteur soit importante pour éviter l'apparition d'une telle réponse. L'injection intramusculaire d'un AAVr par exemple la favorise par rapport à une perfusion du membre entier (Toromanoff et al., 2009). Une explication serait la surexpression dans un site très localisé d'une protéine et la sur-présentation d'antigènes qui en sont issus par rapport à l'injection par perfusion (Chenuaud et al., 2004a; Toromanoff et al., 2009; Wang et al., 2005).

Quoiqu'il en soit, la présence de réponses immunitaires contre le vecteur et le transgène a poussé un certain nombre d'équipe à travailler sur des méthodes visant à l'endiguer. Concernant la réponse antivirale, les anticorps et les épitopes d'AAV2 reconnus par le système immunitaire ont été caractérisés (Moskalenko et al., 2000; Wistuba et al., 1997; Wobus et al., 2000). Des modifications de la capsid e d'AAV2 dans ces épitopes ont permis une baisse de plus de 70% de l'affinité des anticorps contre la capsid e (Huttner et al., 2003).

Concernant les réponses anti-transgènes, des études reposant sur les mécanismes d'anergie (défaut d'activation de la réponse innée) ou de tolérance (éducation de système immunitaire à reconnaître le transgène comme sien) sont en cours (résultats non publiés, INSERM U649 ; (Zaiss and Muruve, 2008)).

Enfin, la mise en place d'un système d'anergie par régulation de l'expression à l'aide de miRNA permettrait en théorie d'empêcher la réponse immunitaire en bloquant l'expression du transgène dans les cellules dendritiques matures, cellules présentatrices d'antigènes et activatrices des cellules effectrices de la réponse immunitaire (Brown et al., 2007b). De plus, toujours à l'aide de miRNA, il a été montré que l'expression restreinte dans le foie du facteur IX de coagulation chez les souris hémophiles de type B permettait une expression à long terme de la protéine, en bloquant l'apparition d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène (Brown et al., 2007a).

Les traitements actuels pour réduire la réponse immunitaire dans les essais de transfert de gène se servent de molécules immunosuppressives déjà sur le marché, servant à la tolérance du greffon chez les patients transplantés (Mingozzi et al., 2007; Mingozzi et al., 2008). Il n'y a aucun doute aujourd'hui de la place qu'occuperont à l'avenir les questions d'immunogénicité de l'ensemble vecteur/transgène et les moyens de les réduire.

## 2 *Les stratégies correctives*

---

Sans vouloir dresser une liste exhaustive des nouvelles stratégies en thérapie génique, je ne parlerai pas de l'ARN interférence par exemple mais insisterai plus sur les moyens développés pour orienter l'épissage, on peut tout de même noter l'existence de certaines possibilités correctives, s'adressant autant au gène qu'à l'ARN qui en est issu.

### **2.1 Réparation au niveau du gène**

#### **2.1.1 L'altération ciblée de gène**

L'altération ciblée de gène (TGA pour *Targeted Gene Alteration*) est une technique grâce à laquelle une reprogrammation du gène est rendue possible par le simple apport d'un oligonucléotide antisens (je parlerai dans ce manuscrit de « reprogrammation » pour définir une modification de la séquence primaire d'un gène ou de son ARN). Lors des essais de reprogrammation par TGA, l'oligonucléotide, synthétisé sous forme de chimère ADN/ARN ou sous forme d'oligonucléotide ADN chimiquement modifié, sera totalement complémentaire de la zone ciblée, hormis pour la mutation. Durant la phase de réplication du génome cellulaire (phase S), la machinerie de réparation de l'ADN reconnaîtra le changement de conformation de la double hélice d'ADN au niveau du mésappariement, et pourra échanger la base mutée pour la base non mutée (Parekh-Olmedo and Kmiec, 2007) (**Figure 1a**). Les applications de cette stratégie sont nombreuses, et englobent un grand nombre de maladies. Ainsi, le pouvoir du TGA comme arme de reprogrammation de gènes dont l' $\alpha$ -D-galactosidase, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -globine ou encore le facteur IX de coagulation a été étudié (Liu et al., 2003).

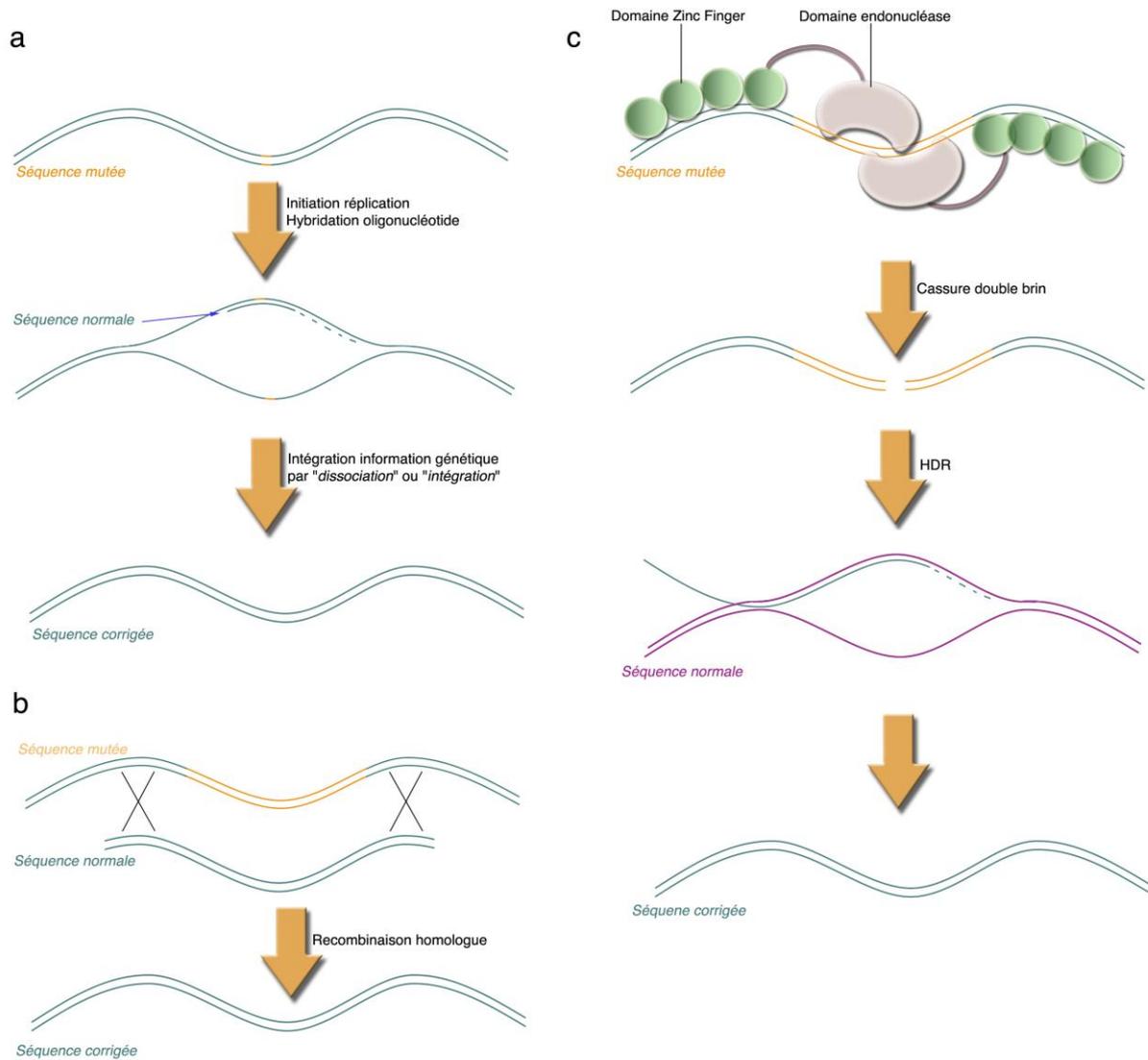
Des taux de reprogrammation de 20% de l'UDP-glucuronosyltransferase, associés à une baisse de 25% du taux de bilirubine sérique ont été observés dans le foie de rats Crigler-najjar (Kren et al., 1999), mais seulement de 0,2% dans l'œil de souris déficientes pour la phosphodiesterase  $\beta$  (Andrieu-Soler et al., 2007) et de 5% dans le muscle de souris mdx

(Bertoni et al., 2005; Rando et al., 2000). Les mêmes taux ne sont pas retrouvés entre différents types cellulaires ou différentes mutations. Le TGA, dont l'efficacité semble très liée à la réplication de l'ADN cellulaire d'une part, et au mode de transfert du matériel génétique d'autre part, doit donc voir sa reproductibilité renforcée.

## 2.1.2 L'édition de gène

### 2.1.2.1 Principe et résultats obtenus

La recombinaison homologue a elle aussi été étudiée comme approche curative. Brièvement, l'apport dans la cellule d'une séquence ADN double brin, entourée de séquences homologues aux séquences flanquantes de la zone à reprogrammer permet le déclenchement d'une réaction de recombinaison homologue, aboutissant à l'insertion du matériel génétique choisi en lieu et place du matériel endogène (**Figure 1b**). Cette technique est très utilisée pour créer des modèles animaux (murins notamment) dont un gène est inactivé de façon ciblée, voir de façon inducible (*knock-out +/- conditionnels*). L'idée ici serait de se servir du pouvoir recombinant de l'ADN non plus pour inactiver, mais au contraire pour réactiver, de façon somatique et ciblée, un gène défectueux. Dans ce cadre, l'utilisation de vecteurs rétroviraux, adénoviraux et AAV porteurs des séquences recombinantes a été montrée possible (Hendrie and Russell, 2005). Cependant, l'efficacité de ce système est le principal facteur limitant. En effet, dans les meilleures conditions, le transfert *in vivo* chez la souris MPS VII par vectorisation AAV (Miller et al., 2006) ou *in vitro* en cellules souches embryonnaires simiennes par vectorisation adénovirale (Suzuki et al., 2008) de séquences à pouvoir recombinant permet la correction de 2 cellules sur  $10^5$  cellules malades. En conséquence, il est préférable de se situer dans un environnement cellulaire prolifératif, dans lequel le gain de fonction apporte un avantage sélectif aux cellules corrigées par rapport aux cellules malades. Cette limite ferme la porte à un certain nombre d'applications. Enfin, des événements de recombinaison non-homologue sont fréquemment retrouvés (Hendrie and Russell, 2005), bien que la vectorisation virale semble améliorer ce défaut (Mitani et al., 1995; Wang and Taylor, 1993).



**Figure 1 :** Les stratégies de réparation de l'ADN

Trois possibilités pour reprogrammer le génome. **a** : Altération ciblée de gène. L'apport d'un oligonucléotide simple brin dans la cellule permet son hybridation sur la cible d'intérêt durant la phase S du cycle cellulaire. L'oligonucléotide sera ensuite copié/dissocié (reprogrammation par dissociation) ou intégré dans le génome (reprogrammation par intégration). Il résulte de cette réaction un allèle muté et un allèle corrigé, amplifié au cours des divisions cellulaires. **b** : Recombinaison homologue. L'apport d'une séquence reprogrammatrice entourée de séquences complémentaires à la cible permet son insertion directe dans le génome hôte. **c** : Utilisation des zinc finger nucléases. Les zinc finger nucléases sont construites de telle sorte que le domaine de liaison à l'ADN reconnaisse un site spécifique près de la mutation. Le domaine nucléase produit une cassure double brin dans le génome. Une séquence non mutée est parallèlement insérée dans la cellule et sert de modèle au complexe de réparation (HDR pour *Homology Directed Repair*). La séquence mutante est alors corrigée. Le principe d'utilisation des méganucléases est le même.

### 2.1.2.2 Utilisation des Zinc Finger Nucléases et des Méganucléases

#### 2.1.2.2.1 Principe d'utilisation des Zinc Finger Nucléases

Cela dit l'utilisation de Zinc Finger Nucléases (ZFN) apporte une solution au problème d'efficacité de recombinaison (Cathomen and Joung, 2008; Porteus and Carroll, 2005). Dans cette approche, la création d'une cassure double brin dans un locus choisi du génome est utilisée pour activer les complexes de réparation de l'ADN et ainsi augmenter la fréquence de reprogrammation de plusieurs milliers de fois (Beumer et al., 2006; Bibikova et al., 2003; Lombardo et al., 2007; Moehle et al., 2007; Urnov et al., 2005) (**Figure 1c**).

Les ZFN sont des protéines artificielles issues de la fusion de domaines Zinc Finger et d'un domaine porteur d'une activité endonucléase (Kim et al., 1996) (**Figure 1c**). Les domaines Zinc Finger de type  $C_2H_2$  sont les domaines de liaison de certains activateurs de transcription. Plus de 900 de ces domaines sont connus (High, 2005) et se lient à des séquences promotrices spécifiques. Ils ciblent des répétitions de 3-4pb. Théoriquement, des domaines de liaison Zinc Finger peuvent être créés pour toutes les possibilités de séquences (Carroll et al., 2006). En combinant différents domaines ciblant différents triplets et/ou en altérant un acide aminé par génie génétique, la spécificité de ciblage peut être changée. La mise en tandem de ces domaines au sein d'une protéine confère au domaine de liaison à l'ADN résultant une spécificité statistiquement unique dans le génome.

La fusion de ces domaines de liaison à une endonucléase permet de rediriger l'action de l'endonucléase vers un site choisi. FokI notamment est une des endonucléase les plus utilisées. Elle agit sous forme de dimère. Pour être utilisée associée aux domaines Zinc Finger, le domaine de liaison naturel de FokI a été délété, et le domaine endonucléase lié au domaine Zinc Finger. Ainsi, la création d'un hétérodimère, constitué des 2 sous unités de FokI associées à 2 sites de liaison à l'ADN flanquant la mutation est donc envisageable (Cathomen and Joung, 2008; Porteus and Carroll, 2005).

Le principe d'action des ZFN résultantes est simple. La liaison de la protéine dimérisée sur sa cible provoque une cassure double brin, déclenchant deux mécanismes de réparation. Le premier est le mécanisme impliquant le complexe NHEJ (*Nonhomologous end joining*), reliant les deux brins cassés par l'action de la ZFN. Le second est une forme de recombinaison homologue, la réparation dirigée par homologie (HDR pour *Homology-Directed Repair*), dont le mécanisme naturel d'action est de réparer la cassure en copiant la séquence du 2<sup>ème</sup> allèle génomique (Cathomen and Joung, 2008; Porteus and Carroll, 2005). Appliquée au domaine thérapeutique, la présence d'une séquence normale dans une cellule déficiente permet au complexe de réparation de copier la séquence thérapeutique en lieu et place de la séquence mutée (**Figure 1c**).

#### 2.1.2.2.2 Utilisation des Zinc Finger Nucléases

Une utilisation des ZFN consiste à apporter les ZFN sans séquence réparatrice pour simplement activer le complexe NHEJ et ainsi provoquer une perte de fonction de la protéine ciblée, à l'image de la protéine CCR5, co-récepteur indispensable à l'entrée du HIV dans la cellule (Perez et al., 2008) (**tableau 3**). Les applications de cette technologie en thérapie génique des maladies innées sont i) la correction ciblée de gène (stratégie correctrice) et ii) l'intégration site-spécifique d'un cDNA d'intérêt (stratégie substitutive) (**tableau 3**).

Concernant la réparation ciblée de gène, le gène de l'IL2R $\gamma$  a fait l'objet de beaucoup d'attention (**tableau 3**). Des taux de reprogrammation de 18% (Urnov et al., 2005) et 39% (Lombardo et al., 2007) ont même été obtenus en cellules immortalisées.

Concernant l'insertion de cassettes d'expressions dans un locus choisi, deux études font actuellement preuve de concept. La première montre la possibilité, après transfection du matériel recombinant, d'intégrer jusqu'à presque 8kb d'information génétique dans l'exon 5 du gène codant l'IL2R $\gamma$ , avec une efficacité atteignant 8%, sans sélection, en cellules immortalisées (Moehle et al., 2007). Dans la deuxième étude, menée par l'équipe de Luigi Naldini (Lombardo et al., 2007), les éléments recombinants ont été clonés dans un vecteur

lentiviral déficient pour l'intégration, ce qui a permis d'atteindre une efficacité de 6,3% de reprogrammation dans le même locus (exon 5 de l'IL2R $\gamma$ ) en cellules immortalisées et de 2,4% en cellules lymphoblastoïdes. Cette équipe a aussi étudié le pouvoir intégratif dans un deuxième locus, le gène CCR5, atteignant une efficacité de 0,11% en cellules souches hématopoïétiques, de 5,4% dans des lignées lymphoblastoïdes, de 50% en cellules K562 et Jurkat, et de 5,3% en cellules souches embryonnaires (cellules ES).

Il est probable que ces quelques études provoquent, dans les années à venir, un engouement pour ces possibilités d'intégrations ciblées et que cette possibilité soit largement étudiée, en utilisant comme l'a fait Luigi Naldini les lentivirus non intégratifs comme vecteurs viraux, s'affranchissant ainsi des intégrations ayant beaucoup fait parler d'elles à la suite de l'essai clinique sur les enfants X-SCID (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003a; Hacein-Bey-Abina et al., 2003b).

Gène cible	But	Références
<b><i>Thérapie génique substitutive</i></b>		
CCR5 IL2R $\gamma$	Intégration site-spécifique	Lombardo et al. 2007 Moehle et al. 2007
<b><i>Thérapie génique corrective</i></b>		
IL2R $\gamma$	Correction mutation	Urnov et al. 2005, Lombardo et al. 2007, Maeder et al 2008
CFTR $\beta$ -globine		Porteus 2006 Maeder et al. 2008 Porteus 2006
<b><i>Perte de fonction</i></b>		
CCR5	Inhibition entrée HIV	Perez et al 2008
ADN mitochondrial	Perte de fonction gènes dominants négatifs	Minczuk et al. 2008
VEGF-A HoxB13	Stratégies anticancéreuses	Maeder et al. 2008 Maeder et al. 2008
DHFR		Établissement de lignées KO

**Tableau 3 : Exemples d'utilisation des ZFN.**

*CCR5* : Récepteur aux chémokines de type 5 ; *IL2R $\gamma$*  : sous-unité  $\gamma$  du récepteur à l'IL2 ; *CFTR* : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator ; *VEGF-A* : facteur de croissance vasculaire-endothélial de type A ; *HoxB13* : protéine à homéobox de type 13 ; *DHFR* : Dihydrofolate réductase.

2.1.2.2.3 Limites et enjeux actuels de l'utilisation des Zinc Finger Nucléases

L'utilisation des ZFN en thérapie génique somatique doit encore prouver son innocuité (Lombardo et al., 2007; Miller et al., 2007; Porteus and Carroll, 2005). En effet, la surexpression des ZFN a été montrée toxique pour la cellule (Bibikova et al., 2002; Porteus and Baltimore, 2003). Il est aujourd'hui pensé que cette toxicité est due i) à un défaut de spécificité des nucléases lors de leur surexpression, ii) à l'activation du complexe de réparation NHEJ, réparant les cassures de façon potentiellement mutagénique, et iii) à la possibilité de translocations chromosomiques causées par les cassures doubles brins (Porteus and Carroll, 2005). Les enjeux actuels dans ce domaine sont donc principalement de garantir la sécurité de ce genre de traitements, en augmentant notamment la spécificité d'action des ZFN (Carroll et al., 2006; Cornu et al., 2008; Miller et al., 2007; Minczuk et al., 2008; Pruett-Miller et al., 2008; Ramirez et al., 2008; Szczepek et al., 2007)

2.1.2.2.4 Les Méganucléases

Les méganucléases, telles que I-SceI, sont des enzymes catalysant naturellement la duplication de leur propre séquence codante dans le génome en créant des cassures doubles brins. Elles agissent en reconnaissant des séquences de 14pb à 40pb (Porteus and Carroll, 2005). Le principe d'utilisation des méganucléases en thérapie génique est le même que celui des Zinc Finger Nucléases (**figure 1c**). En créant des cassures doubles brins dans le génome de la cellule hôte, elles activent les mécanismes de réparation de la cellule et permettent d'augmenter le taux de correction dans les stratégies d'édition de gène (Arnould et al., 2007; Choulïka et al., 1995; Cornu and Cathomen, 2007; Paques and Duchateau, 2007; Rouet et al., 1994; Smih et al., 1995). Cependant, bien que plusieurs centaines de méganucléases aient été identifiées, tous les gènes de mammifères ne portent pas un site de reconnaissance à ces enzymes. Des stratégies visant à la modification de la séquence de reconnaissance de l'enzyme représentent un champ de recherche, et ont permis de créer des enzymes capables de reconnaître de nouveaux sites (Arnould et al., 2006; Epinat et al., 2003; Paques and Duchateau, 2007; Rosen et al., 2006; Smith et al., 2006).

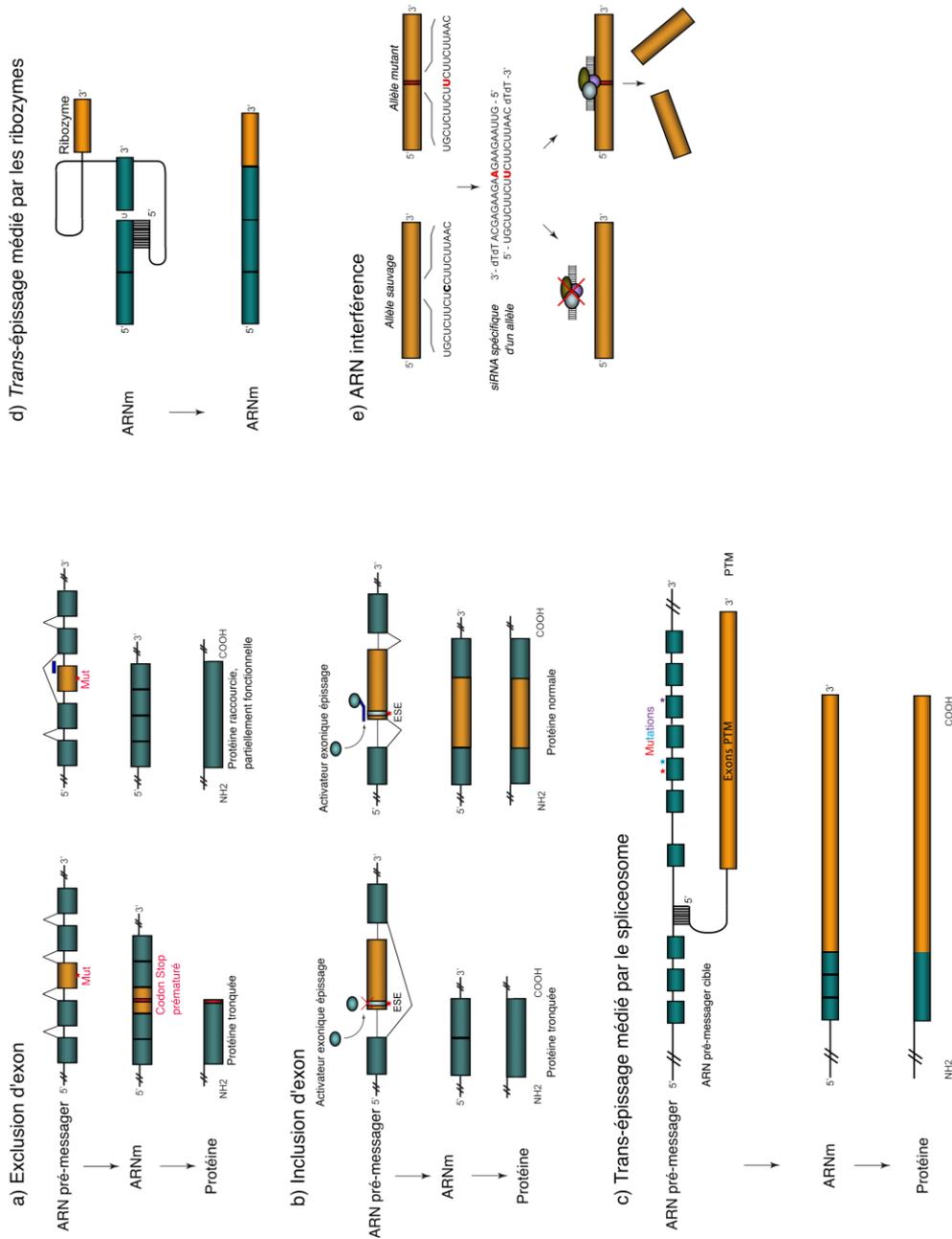
## **2.2 Réparation de l'ARN**

### **2.2.1 Stratégies générales**

À l'instar des manipulations au niveau du gène, nombre d'équipes se sont intéressées aux possibilités de reprogrammer, moduler ou détruire l'ARN (pré)-messager qui en est issu (**Figure 2**). Des manipulations de l'ARN pré-messager au moment de son épissage mais aussi de l'ARN messager mature ont été rendues possibles par la découverte de phénomènes naturels, de l'épissage alternatif à l'ARN interférence (Wood et al., 2007).

Les manipulations de l'épissage seront plus amplement développées dans ce manuscrit (**Figure 2a, b et c**), mais brièvement, les manipulations de l'ARN messager mature sont de deux sortes. Premièrement, l'ARN interférence permet de détruire un ARN messager (siRNA) ou de réguler sa traduction (miRNA) de façon spécifique (**Figure 2e**). En effet, le mécanisme naturel d'action des siRNA implique une très bonne spécificité à la cible. Ils peuvent donc être utilisés pour détruire un isoforme ou l'ARNm issu d'un allèle donné. L'engouement autour de leur utilisation s'explique par leur spécificité, mais aussi par leurs champ d'applications. Ils sont par exemple utilisés pour réduire l'expression d'oncogène dans la lutte anticancéreuse, de protéines pathogène contre la prolifération virale, de gènes à caractère dominant négatif dans la recherche contre les maladies dominantes. De plus, ils permettent l'étude fondamentale du rôle d'un gène particulier en induisant l'arrêt de son expression (Aagaard and Rossi, 2007).

Deuxièmement, les ribozymes sont une famille d'ARN à pouvoir catalytique, dans laquelle le ribozyme de groupe I permet une reprogrammation de l'ARN messager. Dérivés des introns autocatalytiques de groupe I, ils sont constitués d'un domaine de liaison leur conférant une spécificité d'action, d'un domaine ribozyme et d'un exon en 3'. Suite à son hybridation sur l'ARN messager mature, le ribozyme catalyse une réaction de *trans*-épissage entre la partie 5' de la cible et la partie 3' du ribozyme (**Figure 2d**).



**Figure 2 :** Les stratégies de réparation de l'ARN.

Plusieurs stratégies de réparation de l'ARN existent. **a :** l'exclusion d'exon permet au spliceosome, en présence d'un oligonucléotide spécifique d'un site d'épissage, de sauter un exon. Dans le cas d'une insertion de codon stop prématuré (dystrophie musculaire de Duchenne), le saut d'exon peut permettre la traduction d'une protéine plus courte que la protéine normale, mais partiellement fonctionnelle. **b :** l'inclusion d'exon est rendue possible par l'apport d'un oligonucléotide porteur de séquence de recrutement d'activateurs de l'épissage (ASF/SF2, SC35). **c :** le *trans*-épissage permet la reprogrammation complète de la séquence dans une réaction tripartite entre le spliceosome, la cible à reprogrammer et le PTM (Pre-Trans-splicing Molecule). **d :** Un autre type de *trans*-épissage existe, dans lequel un ribozyme est capable de reprogrammer une molécule d'ARN mature. **e :** l'ARN interférant quant à lui permet la destruction spécifique d'un ARNm jugé délétère. Cette technique permet entre autres de s'adresser à des maladies dominantes et de détruire un isoforme ou un ARNm issu d'un allèle muté. *Adapté de (Wood et al., 2007)*

La réparation de messager a été utilisée pour reprogrammer des ARNm codant la  $\beta$ -globine (Lan et al., 1998), le gène DMPK (*Dystrophia Myotonica-protein kinase*) (Phylactou et al., 1998), mais aussi p53 et p16 (Kastanos et al., 2004; Shin et al., 2004). De plus, l'introduction du gène herpétique de la thymidine kinase en 3' d'un gène surexprimé dans la majorité des carcinomes a été montrée possible (Jung and Lee, 2006). Les ribozymes pourraient en théorie être utilisés dans un grand nombre de modèles pathologiques. Cependant, ces résultats ont été obtenus *in vitro*, et leur développement semble compromis par leur faible efficacité *in vivo* (Wood et al., 2007).

Nous allons maintenant plus précisément nous intéresser aux possibilités de thérapie génique par modulation de l'épissage, en nous focalisant sur les trois grandes possibilités de travail qu'offrent les ARN pré-messagers, à savoir l'inclusion et l'exclusion forcées d'exon, et le *trans*-épissage médié par le spliceosome (**Figure 2a, b et c**).

## 2.2.2 L'épissage

### 2.2.2.1 À propos de maturation d'ARN

À la fin des années 1970, il a été découvert que, chez les eucaryotes, les séquences d'un gène, de l'ARN produit par ce gène et de la protéine correspondante ne sont pas organisées de façon superposable, comme c'est le cas chez les bactéries (Breathnach et al., 1977; Jeffreys and Flavell, 1977; Tilghman et al., 1978; Tonegawa et al., 1978; Weinstock et al., 1978). En effet, les gènes eucaryotes sont d'abord transcrits sous la forme de précurseurs, appelés ARN pré-messagers. La structure d'un ARN pré-messager est précisément superposable à celle du gène dont il est issu. Ces précurseurs contiennent une alternance d'exons (*expressed regions*) et d'introns (*intragenic regions*). Les ARN pré-messagers subissent l'épissage, une réaction pendant laquelle les introns sont excisés et les exons reliés entre eux. Cette modification, associée à l'addition d'une coiffe en 5' et d'une queue poly-A en 3', contribue à la production d'un ARNm mature, qui pourra être transporté du noyau vers le cytoplasme, et traduit en protéine.

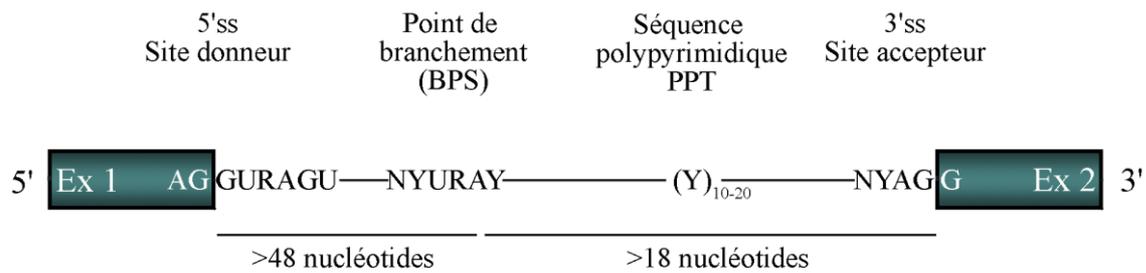
Il existe plusieurs types d'introns, classés selon leur structure et leur mécanisme d'excision. On distingue notamment les introns autocatalytiques de groupe I et II (capables de s'auto-épisser) (Fedorova and Zingler, 2007; Scott, 2007), les introns des ARN de transfert (ou ARNt) et les introns des ARN pré-messagers nucléaires. Il existe deux classes d'introns dans les ARN pré-messagers nucléaires (Sharp, 1994). Les introns retrouvés le plus fréquemment commencent par le dinucléotide GU (ou GT au niveau du gène initial) et se terminent par le dinucléotide AG. D'autres introns plus minoritaires commencent par un AU (ou AT dans le gène initial) et finissent par un AC. Seul l'épissage des introns de type « GT-AG » sera développé dans ce manuscrit.

#### 2.2.2.2 Mécanisme d'épissage des introns de type GT-AT

##### 2.2.2.2.1 Les sites consensus d'épissage

L'épissage des introns de type « GT-AG » fait intervenir deux réactions de *trans*-estérifications successives, qui passent par la reconnaissance de séquences consensus, appelées sites d'épissage et situées aux jonctions intron/exon et exon/intron (Breathnach et al., 1978). Les séquences consensus de ces sites d'épissage sont représentées sur la **figure 3** (Baralle and Baralle, 2005).

Le dinucléotide GU dans le site 5' d'épissage (5'ss) et le dinucléotide AG dans le site 3' d'épissage (3'ss) sont pratiquement invariables. La séquence « point de branchement » (ou BPS, pour *Branch Point Sequence*), assez mal conservée, a malgré tout été montrée prépondérante dans la réaction d'épissage (Rautmann and Breathnach, 1985).

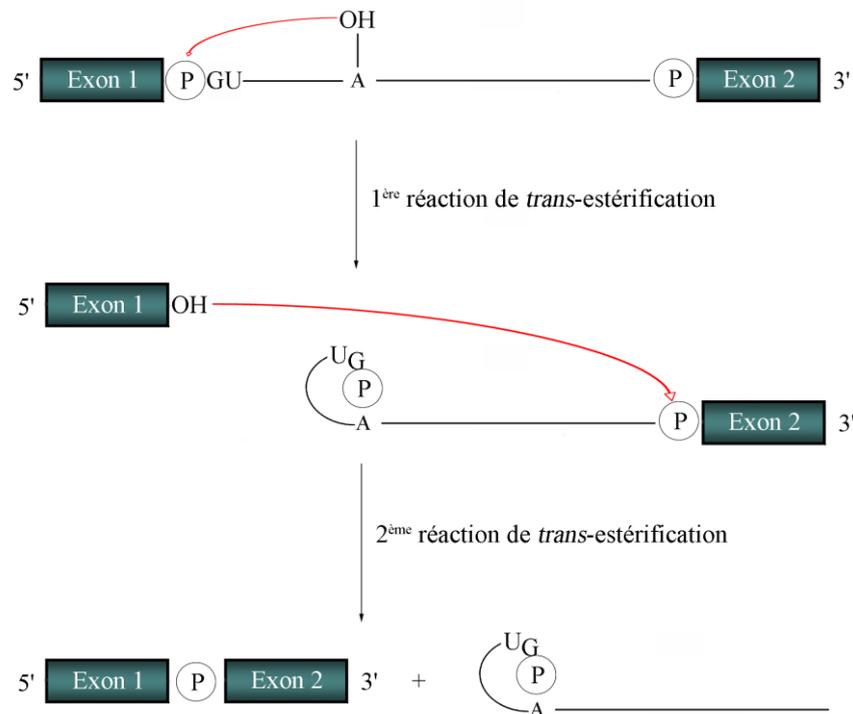


**Figure 3 :** Séquences consensus des sites d'épissage

Y=T/C; R= A/G ; N= A, G, T ou C.

#### 2.2.2.2.2 La réaction d'épissage

La réaction d'épissage se déroule en deux étapes (**Figure 4**). La première étape consiste en la coupure du 5'ss, séparant l'exon 1 et la molécule intron/exon 2. L'exon 1 garde la forme d'une molécule linéaire, alors que la molécule intron/exon 2 forme une structure en lasso, dans laquelle la guanine de l'extrémité 5' de l'intron vient se lier, par une liaison 2'-5' phosphodiester, à l'adénine du point de branchement. La deuxième étape consiste en la coupure du 3'ss à la jonction intron/exon 2, suivie de la ligation des exons 1 et 2, et de la libération de l'intron en lasso qui sera ensuite rapidement dégradé. Chacune de ces deux étapes a lieu grâce à une réaction de *trans*-estérification au cours de laquelle un groupement terminal hydroxyle libre attaque une liaison phosphodiester (Sharp, 1994). Les introns de type GT-AG ne sont pas autocatalytiques. La réaction d'épissage pour ces introns nécessite la présence d'une machinerie nucléoprotéique, le spliceosome, capable de contrôler le choix des sites d'épissage et l'excision des introns.



**Figure 4 :** L'épissage d'un ARN pré-messager nucléaire, un processus qui fait intervenir deux réactions de *trans*-estérification.

#### 2.2.2.2.3 Le spliceosome, composition et formation

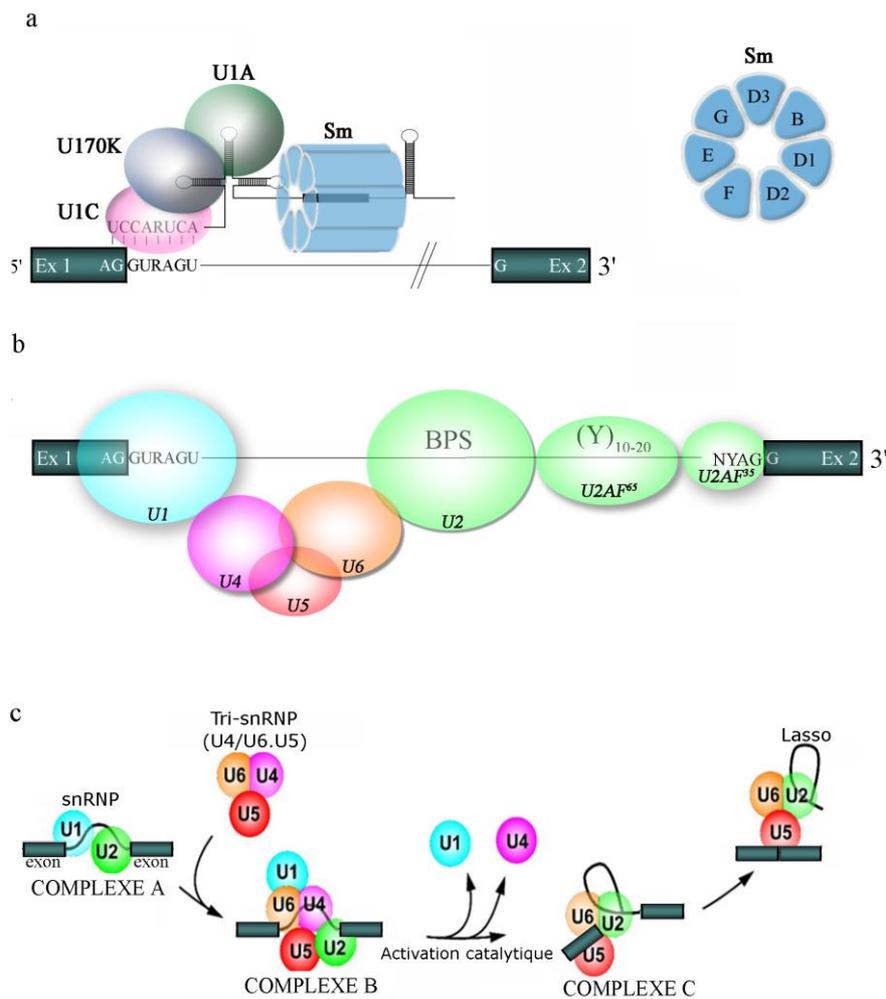
Le spliceosome contient des snRNA (pour *small nuclear Ribonucleic Acid*), dont certains possèdent des séquences complémentaires aux séquences consensus des sites d'épissage. Ils prennent des structures secondaires très stables et reproductibles, et sont associés à des protéines. L'ensemble ARN-protéine forme les snRNP (pour *small nuclear Ribonucleoprotein*). Le spliceosome contient cinq snRNP : les snRNP U1, U2, U4, U5 et U6. Chaque snRNP contient des protéines spécifiques, associées à un cœur structural de sept protéines, appelées protéines Sm, commun à tous les snRNP (**Figure 5a**). Les protéines Sm ont un rôle dans la constitution et le transport des snRNP (Matlin et al., 2005; Will and Luhrmann, 2001). Il semble que les snRNA soient véritablement la partie fonctionnelle du spliceosome, et qu'ils catalysent la réaction d'épissage, alors que les protéines des snRNP

pourraient avoir des rôles secondaires, mais néanmoins indispensables dans cette réaction, agissant comme des cofacteurs en stabilisant par exemple les ARN (Newman, 2001; Valadkhan and Manley, 2001; Valadkhan et al., 2007).

La formation du spliceosome a lieu séquentiellement, et permet l'agrégation des snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 (**Figure 5b et 5c**). Premièrement, un complexe E est formé suite à la liaison de snRNP U1, de U2AF et de la protéine SF1 sur les sites 5'ss, PPT/3'ss et BPS, respectivement. SF1 est ensuite désolidarisée du complexe pour permettre à la snRNP U2 de s'apparier sur le BPS, aboutissant au complexe A (**figure 5c**). Le tri snRNP U4/U5/U6 interagit alors avec le complexe A pour former le complexe B. C'est à ce moment qu'une boucle est formée, dans laquelle les deux extrémités de l'intron sont rapprochées. Le désengagement des snRNP U1 et U4 permet alors la formation du complexe C, dans lequel le snRNP U5 se lie au site 5'ss grâce à la libération de l'emprise du snRNP U1, et le snRNP U6, libéré par le snRNP U4, se lie avec le snRNP U2 et le 5'ss. Le snRNA U5 se rapproche, alors du 3'ss. Finalement, le complexe C est donc le lieu où se déroulent les deux réactions de *trans*-estérification, aboutissant à la liaison des deux exons et à la libération de l'intron en lasso. Par la suite, les snRNP sont recyclées vers une autre réaction d'épissage, alors que le lasso est dégradé (**figure 5c**) (House and Lynch, 2008; Sharp, 1994).

Outre les cinq snRNP, le spliceosome contient aussi de nombreuses protéines non snRNP (House and Lynch, 2008; Sharp, 1994). Parmi ces protéines non snRNP, on trouve notamment les protéines U2AF<sup>65</sup> et U2AF<sup>35</sup>, permettant l'accrochage de la snRNP U2 sur le point de branchement, par action combinée avec la protéine SF1. De plus, on retrouve les protéines SR, qui jouent un rôle primordial dans l'épissage (Graveley, 2000) (**Figure 5**). Une protéine SR typique est composée de deux domaines : un domaine RBD (pour *RNA Binding Domain*) ou RRM (pour *RNA Recognition Motif*), et un domaine C-terminal qui contient le dipeptide Sérine-Arginine (domaine SR) répété plusieurs fois en tandem. Les protéines SR sont des facteurs capables de se fixer à l'ARN pré-messager *via* leur domaine RBD, et qui interagissent avec d'autres protéines grâce à leur domaine SR. Dans la famille des protéines SR, on trouve, par exemple, le facteur ASF/SF2 (pour *Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2*), ou encore la protéine SC35. La famille des protéines SR est impliquée à la fois

dans l'épissage constitutif et dans l'épissage alternatif en facilitant la reconnaissance des signaux d'épissage au spliceosome.



**Figure 5:** La reconnaissance des signaux d'épissage par le spliceosome son implication dans l'épissage.

**a** : exemple de composition d'une snRNP. La snRNP U1 est composée du snRNA U1, de 3 protéine spécifique (U1A, U1C et U170K), et de 7 protéines communes à toutes les snRNP, les protéines Sm, se liant sur les structures tiges-boucles ou sur des séquences de reconnaissance. **b** : les protéines du spliceosome et leur emplacement sur l'intron. **c** : la formation du spliceosome permet à la réaction d'épissage d'avoir lieu. La fixation séquentielle des snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 sur leur sites respectifs permet la prise de structure secondaire nécessaire à l'établissement des deux réactions de *trans*-estérifications.

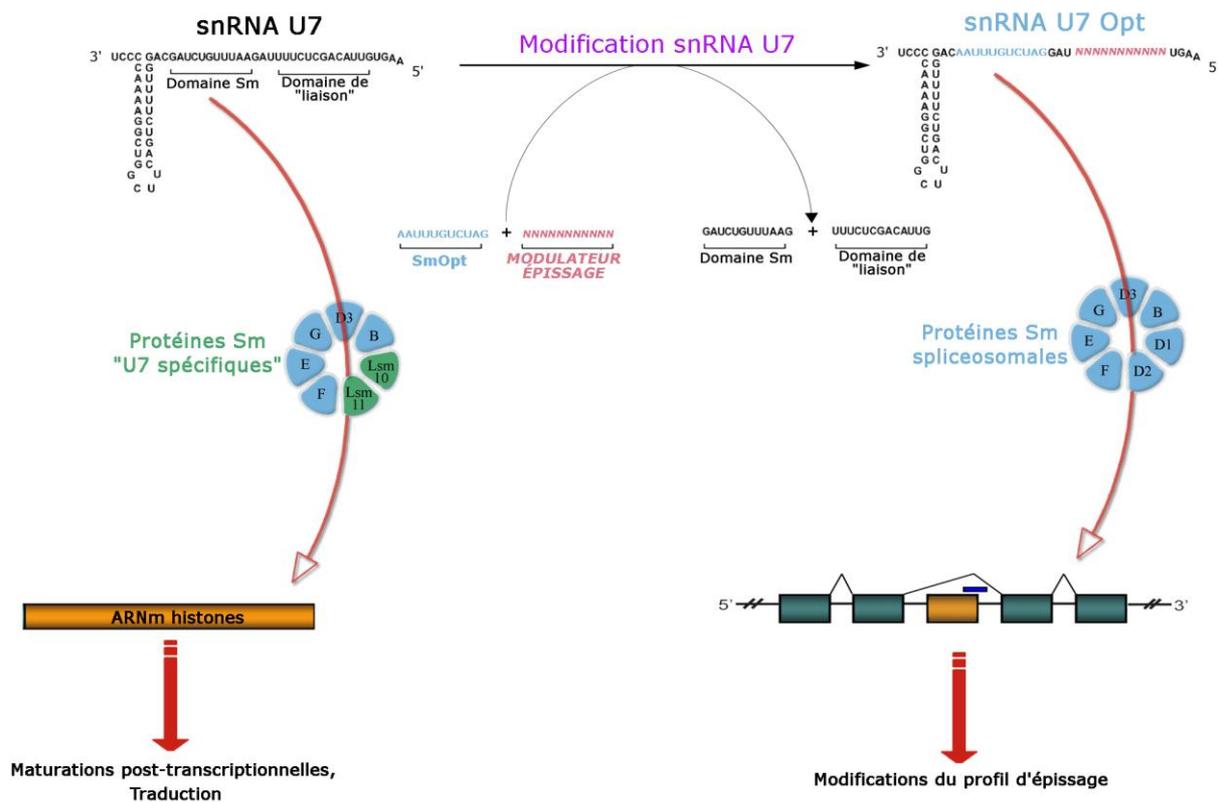
2.2.2.2.4 Le cas du snRNA U7

Le snRNA U7, composant de la snRNP U7, est un snRNA impliqué dans la maturation et le transport des ARN codant les histones. Les gènes codant les histones représentent une classe génique particulière. Premièrement, ils ne sont composés que d'exons et ne nécessitent pas de réaction d'épissage. Deuxièmement, ils ne sont pas polyadénylés en 3'. Leur maturation a lieu en une seule étape, et ne nécessite que la coupure de leur extrémité 3'. Le snRNA U7 et la snRNP correspondante sont impliqués dans ce processus de maturation. La snRNP U7, s'hybridant *via* le snRNA U7 sur une séquence très conservée, la séquence HDE (pour *Histone Downstream Element*) permet l'excision et donc la maturation de l'extrémité 3' des ARN des histones. L'ARN mature sera ensuite exporté vers le cytoplasme puis traduit. D'autres facteurs sont impliqués dans les étapes de maturation et régulation post-transcriptionnelles, à l'image de la protéine SLBP (pour *Stem Loop Binding Protein*) impliquée dans l'initiation de la traduction des ARN (Dominski and Marzluff, 2007).

Le snRNA U7 n'est pas un composant du spliceosome, puisqu'il ne se lie pas aux mêmes protéines que les snRNA U1, U2, U4, U5 et U6. Plus précisément, une différence importante réside dans les protéines Sm qu'il recrute : les protéines D2 et D3 recrutées par les snRNA du spliceosome sont remplacées par les protéines Lsm10 et Lsm11 (Dominski and Marzluff, 2007) (**Figure 6**).

Il a été montré qu'en modifiant la séquence de recrutement des protéines Sm du snRNA U7, il était possible de recruter sur ce snRNA les protéines Sm du spliceosome. Cette séquence, appelée SmOpt, est identique aux séquences de recrutement des protéines Sm des snRNA du spliceosome. Un snRNA U7 génétiquement modifié a donc vu le jour, dans lequel la séquence de reconnaissance de l'extrémité 3' des histones est éliminée, et capable de recruter les composants Sm spliceosomaux (Gorman et al., 1998) (**Figure 6**). Ces snRNA U7 ont servi dans de nombreuses études d'exclusion d'exon ou d'inclusion d'exon (Asparuhova et al., 2007; De Angelis et al., 2002; Goyenvalle et al., 2004; Liu et al., 2004; Marquis et al.,

2008; Marquis et al., 2007; Suter et al., 1999). En effet, en remplaçant la séquence de liaison aux histones par une séquence spécifique d'un ARN pré-messager d'intérêt, les snRNA U7 permettent de concentrer les séquences antisens dans le noyau cellulaire, dans les sites d'épissage, et augmentent donc l'efficacité d'inclusion ou d'exclusion d'exon .



**Figure 6:** Le snRNA U7 et ses modifications.

Le snRNA U7 se lie à des protéines Sm spécifiques *via* son domaine Sm, puis à l'extrémité 3' de l'ARN des histones *via* un domaine de liaison. En modifiant le domaine Sm et le domaine de liaison par un domaine SmOpt et une séquence antisens spécifique d'un ARN pré-messager d'intérêt, il est possible de concentrer la séquence antisens dans les sites d'épissage du noyau et de se servir du snRNA U7 Optimisé pour augmenter l'efficacité d'exclusion ou d'inclusion d'exon.

#### 2.2.2.2.5 Définition d'exon

Plus un site d'épissage sera « fort », c'est-à-dire plus il sera proche de la séquence consensus, plus son interaction avec les facteurs d'épissage se fera bien. La facilité avec laquelle un site d'épissage est reconnu par le spliceosome impacte donc sur le bon déroulement de la réaction.

Cependant, un gène classique contient plusieurs petits exons internes (d'une taille de 50 à 250 paires de bases) séparés par des introns qui peuvent avoir une longueur de plusieurs kilobases (la taille moyenne d'un intron est de 3500 nucléotides) (House and Lynch, 2008; Wang and Burge, 2008). Dans les introns, il existe de nombreux sites cryptiques d'épissage, qui ont parfois de meilleures séquences consensus que les vrais sites, mais qui ne sont toutefois pas utilisés (Sun and Chasin, 2000). De plus, la production de plusieurs isoformes à partir de la même unité transcriptionnelle par épissage alternatif est un événement très commun dans les cellules de mammifères. Un ARN pré-messager peut subir plusieurs événements d'épissage alternatifs dans différentes régions. Il est d'ailleurs pensé que la plupart des 30 000 gènes humains le subissent, et que la complexité du protéome lui est en grande partie due (Cartegni et al., 2002). Finalement, la nécessité de réguler l'épissage alternatif introduit un degré d'exigence supplémentaire, pour lequel le choix des sites d'épissages actifs varie en fonction du stade de développement, de l'organe, du cycle cellulaire ou du cycle circadien par exemple.

Dès lors, localiser les sites 5' et 3' d'épissage apparaît être une tâche difficile. En effet, bien que des séquences consensus existent, elles sont souvent dégénérées et ne suffisent pas, à elles seules, à la bonne reconnaissance des sites d'épissage (Cartegni et al., 2002).

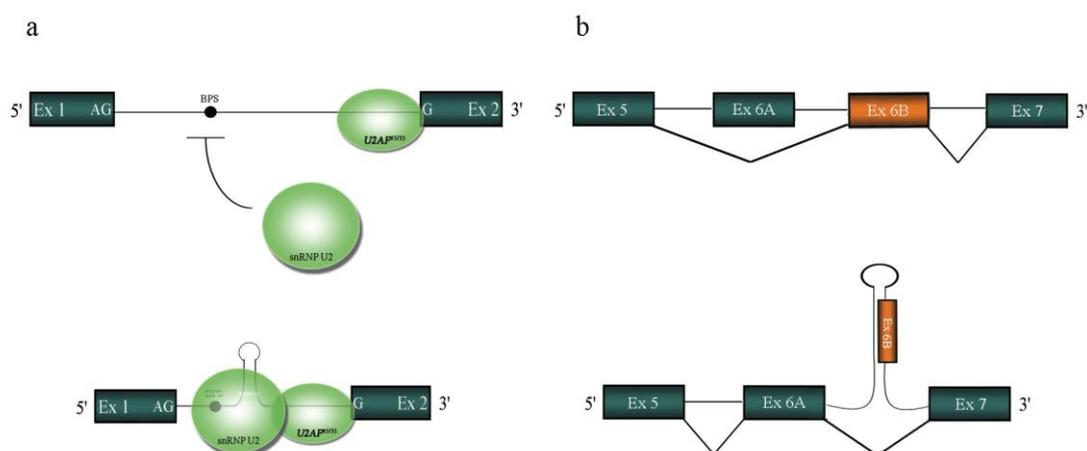
D'autres éléments semblent donc entrer en jeu pour créer un contexte favorable à la reconnaissance d'un site. Ces éléments peuvent être de diverses natures. Ainsi, des structures secondaires peuvent exposer de façon favorable un site d'épissage, ou au contraire masquer

un site cryptique à séquence plus consensus que celle à utiliser. Des protéines peuvent également reconnaître certains éléments (séquences nucléotidiques et/ou structures secondaires), et ainsi favoriser une interaction au niveau du site d'épissage. Ces coopérations protéiques peuvent aussi se faire entre deux sites d'épissage. De nombreuses observations expérimentales vont dans le sens de l'existence de tels éléments.

#### 2.2.2.2.5.1 Par la prise de structures secondaires

Les structures secondaires prises par une molécule d'ARN peuvent jouer un rôle dans la sélection des sites d'épissage. Elles peuvent être créées pour moduler l'accès à un site constitutif d'épissage ou à un cofacteur (activateur ou inhibiteur de l'épissage) par exemple.

Ainsi, l'intron de l'ARN pré-messager de l'adénovirus E1A présente une structure tige-boucle qui permet l'utilisation d'un site de branchement éloigné du 3'ss (Chebli et al., 1989). Dans le gène codant la  $\beta$ -tropomyosine de poulet, l'épissage de l'exon 6B est réprimé dans les cellules non musculaires par une structure secondaire qui se forme entre une séquence située en amont de l'exon 6B, une partie de l'intron en aval de 6B, et des séquences à l'intérieur de l'exon 6B lui-même. Cette structure inhibe la formation du spliceosome sur cet exon. En revanche, dans les cellules musculaires, le relâchement de la structure permet au spliceosome de reconnaître les signaux d'épissage de l'exon 6B, et de l'inclure dans l'ARNm mature (Clouet d'Orval et al., 1991; Gallego et al., 1996) (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Exemples de l'impact des structures secondaires sur la reconnaissance des exons.

**a** : dans le cas de l'ARN pré-messager du gène E1A adénoviral, le BPS nécessaire à la réaction est trop éloigné des sites 3'ss et PPT pour permettre le recrutement de la snRNP U2 par les facteurs U2AF. La création d'une structure tige-boucle permet le rapprochement du BPS, la liaison de snRNP U2, et le déroulement de l'épissage.  
**b** : dans le cas de l'ARN de la tropomyosine de poulet, la formation d'une structure secondaire permet aux cellules non musculaires d'inclure l'exon alternatif 6A, alors que son relâchement dans les cellules non musculaires permet l'inclusion du 2<sup>ème</sup> exon alternatif 6B.

#### **2.2.2.2.5.2 Par le recrutement de modulateurs de l'épissage**

En plus des structures secondaires, il apparaît que la définition des sites d'épissage est régulée par des interactions protéine-ARN et protéine-protéine dans des modèles connus sous le nom de « définition d'exon » et « définition d'intron ». La définition d'exon a lieu grâce à des interactions au travers l'exon entre les facteurs reconnaissant le site 5'ss et le site 3'ss en amont, alors que la définition d'intron a lieu au travers d'interactions entre le site 5'ss et le site 3'ss en aval (Wang and Burge, 2008).

Les deux schémas de définition d'exon et de définition d'intron impliquent l'interaction de facteurs régulateurs de l'épissage sur des sites introniques ou exoniques activateurs ou inhibiteurs de l'épissage (ISE pour *intronic splicing enhancer*, ESE pour *exonic splicing enhancer*, ISS pour *intronic splicing silencer* et ESS pour *exonic splicing silencer*). Trois types de protéines régulatrices sont recrutées sur l'ARN : les protéines de la famille SR, les protéines de la famille hnRNP, et les protéines non-SR et non-hnRNP.

##### **2.2.2.2.5.2.1 Les protéines SR**

Les protéines SR sont composées d'un ou deux domaines RBD en N-terminal, et un domaine riche en arginine et en sérine (le domaine SR) de taille variable en C-terminal. La liaison de la protéine SR sur sa cible se fait grâce au domaine RBD, alors que le domaine SR permet l'interaction de ces facteurs entre eux ou avec d'autres protéines (Graveley, 2000) (**Figure 8a**).

Les fonctions des protéines SR peuvent être divisées en deux catégories : les fonctions exon-dépendantes et les fonctions exon-indépendantes. Les protéines à fonction exon-

indépendantes interviennent dans la définition d'intron, *via* des interactions protéine-protéine qui ont lieu à travers les exons et les introns. Les protéines SR à fonctions exon-dépendantes se fixent sur des séquences exoniques, comme les 5'ss et 3'ss, ou des régions régulatrices plus spécifiques. Elles aident alors au recrutement des facteurs d'épissage, ou empêchent la fixation d'inhibiteurs de l'épissage (Cartegni et al., 2002; Graveley, 2000). Les protéines à fonction exon-indépendante peuvent par exemple avoir un rôle dans l'incorporation du tri-snRNP U4/U5/U6. Quoiqu'il en soit, par ces fonctions, les protéines SR aident au recrutement des facteurs d'épissage lors des premières étapes de la formation du spliceosome, que ce soit lors de l'épissage constitutif ou lors de l'épissage alternatif. Elles ont un rôle dans la définition des introns comme dans la définition des exons. Beaucoup de protéines SR sont donc des facteurs activateurs de l'épissage alternatif, mais certaines peuvent avoir aussi un effet inhibiteur (Mayeda et al., 1999; Zheng et al., 1998) (**Tableau 4 et Figure 8a**).

#### 2.2.2.2.5.2.2 Les protéines hnRNP :

Les hnRNP sont des protéines qui possèdent toutes un domaine RBD en N-terminal, et un domaine auxiliaire, impliqué dans des interactions protéine-protéine, en C-terminal. Ces différentes hnRNP contiennent des domaines RBD qui ont des séquences cibles différentes. Plusieurs membres de cette famille contiennent un domaine auxiliaire riche en glycine, comme la hnRNP A1 par exemple. On trouve aussi des domaines auxiliaires riches en arginine, mais jamais de domaine SR (Gorlach et al., 1994; Pozzoli and Sironi, 2005; Swanson and Dreyfuss, 1988).

Dans l'épissage alternatif plus particulièrement, les hnRNP sont souvent impliquées dans la reconnaissance de séquences ESS et ISS, les éléments inhibiteurs de l'épissage d'exons alternatifs (Maniatis and Tasic, 2002). Elles participent à la non-reconnaissance par le spliceosome des sites cryptiques d'épissage introniques. À nouveau, comme pour les protéines SR, même si la plupart des hnRNP sont des facteurs inhibiteurs de l'épissage, certaines peuvent avoir un rôle activateur (**Tableau 4 et Figure 8b**).

2.2.2.2.5.2.3 Les facteurs non-SR et non-hnRNP :

D'autres facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif n'appartiennent ni à la famille des protéines SR, ni à la famille des hnRNP, tels que les protéines NOVA et TIA-1, facteurs impliqués dans l'épissage du récepteur neuronal gabaergique et du récepteur au FGF de type 2, respectivement (Del Gatto-Konczak et al., 2000; Grabowski, 2000; Le Guiner et al., 2001). Certains de ces facteurs ne sont exprimés que dans certains tissus, et permettent donc une régulation tissu-spécifique de l'épissage alternatif (**Tableau 4 et Figure 8c**).

Protéine	Exemples de gènes cibles connus	Inhibition (-) ou activation (+)	Mécanisme
<b><i>Protéines SR</i></b>			
SRp20	calcitonine	+	Se fixe à un ISE et active l'épissage d'un exon contenant un site de polyadénylation précoce. Agit en coopération avec la protéine PTB.
ASF/SF2	HIV-1	+	Active l'utilisation du site A7 nécessaire à la production des messagers tat et rev. Se fixe à un ESE dans l'exon 3 de tat. Agit en compétition avec la hnRNP A1.
	srp20	-	Entre en compétition avec SRp20 pour l'épissage de l'exon 4.
SC35	$\beta$ -tropomyosine (poulet)	-	Abolit l'effet activateur de ASF/SF2, fixé à un ISE en aval de l'exon 6A.
	HIV-1 tat	+	Se fixe à un ESE.
9G8	fibronectine	+	Se fixe à un ESE.
SRp40	troponine T cardiaque	+	Se fixe à un ESE.
<b><i>Protéines apparentées aux protéines SR</i></b>			
U2AF 65/35	Ubiquitaires	+	Se fixent sur les sites 3'ss et PPT, permettent le recrutement de snRNP U2
hTra2 $\beta$	SMN	+	Se fixe à un ESE sur l'exon 7
SRm 160/300	Ubiquitaires	+	Etablissent un pont protéique entre les snRNP U1, U2 et les protéines SR
<b><i>Protéines hnRNP</i></b>			
hnRNP A1	HIV-1	-	Inhibe l'utilisation du site A7 nécessaire à la production des messagers tat et rev. Se fixe à un ESS dans l'exon 3 de tat. Agit en compétition avec ASF/SF2.
hnRNP F et hnRNP H	c-src	+	Se fixent à un ISE, et provoquent l'inclusion de l'exon N1 dans les cellules neuronales, en collaboration avec la nPTB.
hnRNP K	$\beta$ -tropomyosine (poulet)	+	Est un composant du complexe activateur se fixant sur l'ISE présent en aval de l'exon 6A.
PTB/hnRNP I	$\alpha$ - et $\beta$ -tropomyosine,	-	Se fixe à des séquences introniques riches en pyrimidines flanquant différents exons, et provoque l'exclusion des exons en question.
	calcitonine	+	Dans les cellules non neuronales, se fixe à des séquences en aval de l'exon 4, et provoque son inclusion. Agit en coopération avec SRp20.

**Tableau 4 : Exemples de protéines SR et hnRNP.**  
D'après (Graveley, 2000 ; Zheng, 2004)

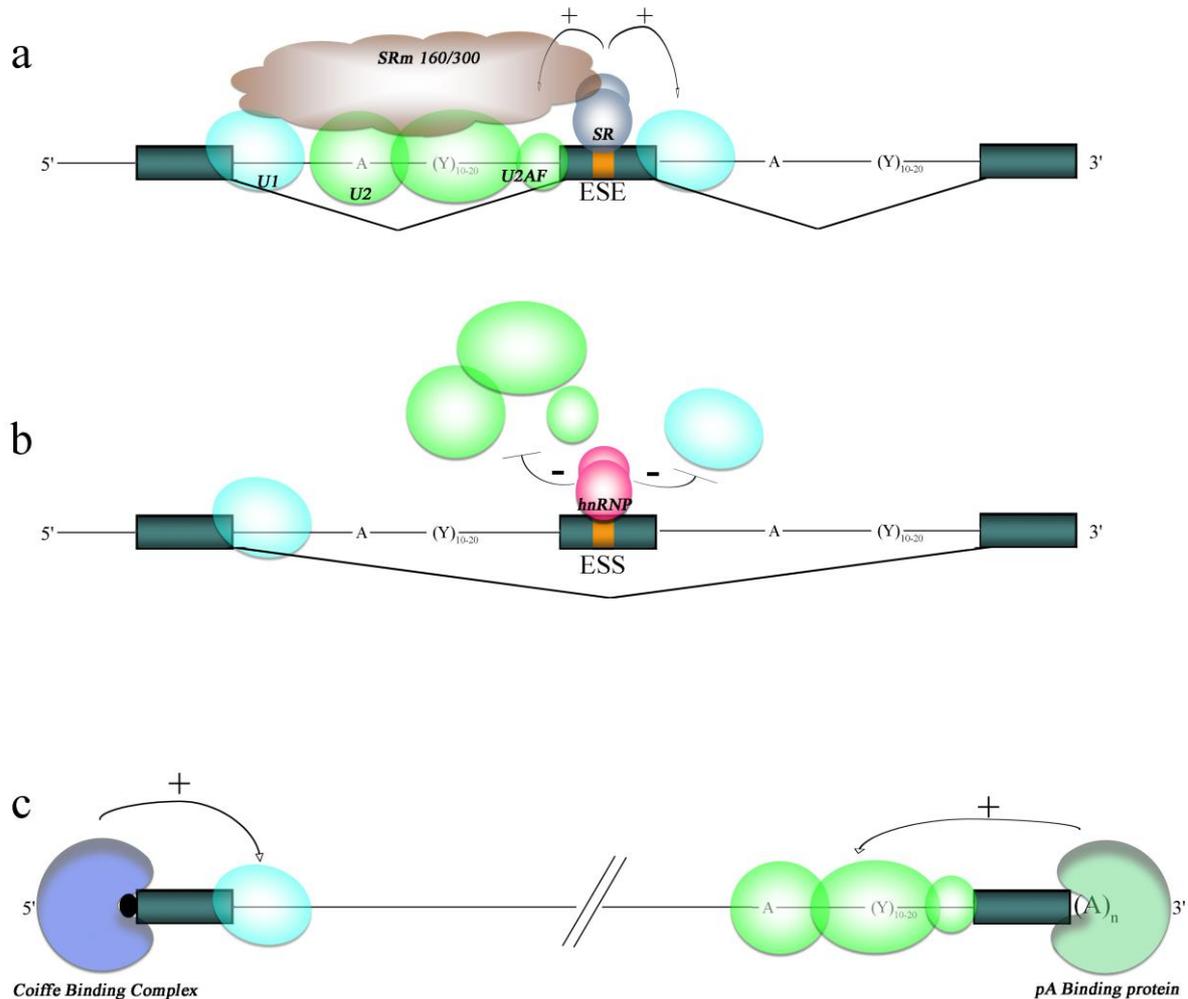
### 2.2.2.2.5.3 Le cas des exons terminaux

La reconnaissance des exons terminaux d'un gène requiert, elle, des mécanismes légèrement différents. En effet, l'exon situé en 5' possède un 5'ss mais pas de 3'ss. Le dialogue entre les deux extrémités de cet exon s'établit grâce à l'intervention d'un complexe nucléaire capable de se fixer sur la coiffe, le CBC (pour *Cap Binding Complex*) (Izaurralde et al., 1994). Pour l'exon situé en 3', le problème est inversé : il y a un 3'ss mais pas de 5'ss. Ici, c'est le complexe de polyadénylation qui permet le dialogue entre les deux extrémités de ce dernier exon (Berget, 1995; Cooke and Alwine, 2002; Cooke et al., 1999) (**Figure 8c**).

Nous voyons donc bien que l'épissage est une réaction complexe, dont le déroulement est sous le contrôle d'un grand nombre d'éléments présents sur en *cis* sur l'ARN pré-messager, mais aussi en *trans*.

Un grand nombre des défauts génétiques engendrant des dysfonctionnements protéiques sont dus à des défauts d'épissage. Par exemple, une mutation sur un site de recrutement d'un modulateur de l'épissage ou d'une snRNP peut bloquer sa liaison et provoquer un défaut d'épissage. De plus, la molécule d'ARN ayant une structure secondaire lui permettant de se servir de sites d'épissages distants des exons à épisser, il est théoriquement possible qu'une mutation sur un intron ou un exon distant engendre un défaut d'épissage. Une mutation, même silencieuse sur le plan du code génétique peut alors avoir des répercussions sévères au niveau protéique.

Cependant, si la réaction d'épissage est si sensible aux variations, cela signifie aussi que la possibilité est laissée de réapprendre au spliceosome l'épissage d'un exon particulier, ou, bien au contraire, de le rendre aveugle face aux signaux d'épissage d'un exon ciblé.



**Figure 8 :** Exemple de définition d'exon par le recrutement de protéines activatrices ou inhibitrices de l'épissage.

**a :** dans le cas des protéines activatrices (protéines SR), la liaison de la protéine sur son site permet le recrutement de composants du spliceosome tels que les snRNP U1 et U2, mais aussi de protéines apparentées aux protéines SR (U2AF). De plus, des liaisons protéines-protéines permettent la stabilisation du complexe, comme dans le cas des protéines SRm qui se lient aux snRNP et aux protéines SR. **b :** Dans le cas d'inhibiteurs de l'épissage, la liaison de la protéine (souvent une hnRNP) empêche le recrutement des composants du spliceosome, résultant en un saut de l'exon concerné. **c :** la définition des exons terminaux passe par une liaison des snRNP aux protéines se liant à la coiffe (exon 5') ou aux protéines se liant à la queue polyA (exon 3').

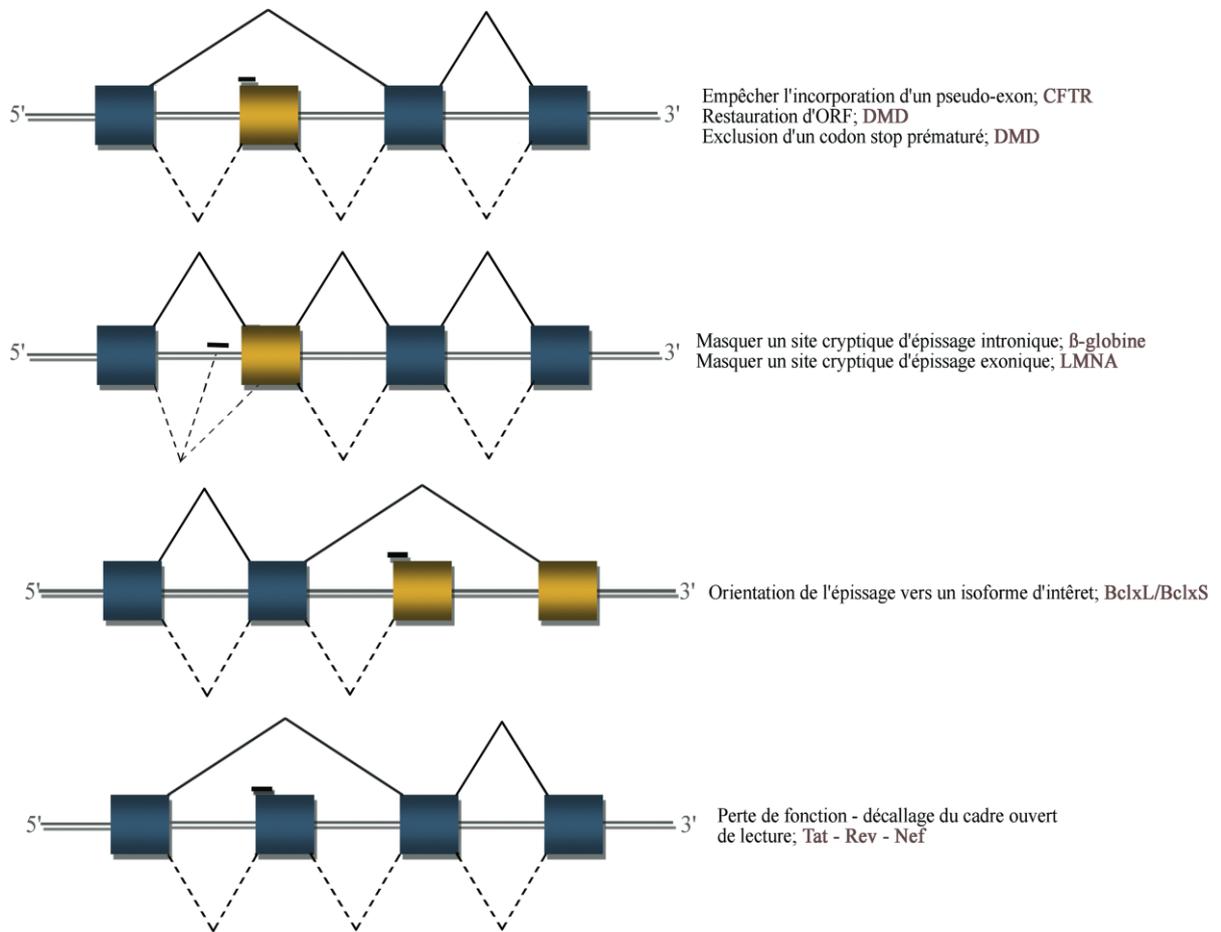
### 2.2.3 Les manipulations de l'épissage

Depuis la découverte de la possibilité de moduler l'épissage à l'aide d'oligonucléotides antisens dans le modèle de la  $\beta$ -thalassémie (Dominski and Kole, 1993; Munroe, 1988), les domaines de l'inclusion et de l'exclusion forcées d'exon ont fait beaucoup de route. Plus précisément, l'exclusion forcée d'exon est aujourd'hui au stade clinique avec un essai clinique effectué aux Pays-Bas (van Deutekom et al., 2007), tandis que le domaine de l'inclusion d'exon voit paraître des essais *in vivo* chez la souris (Dickson et al., 2008; Hua et al., 2008; Meyer et al., 2008).

### 2.2.3.1 Exclusion d'exon

Le saut d'exon est une technique permettant, après introduction d'un oligonucléotide antisens, d'exclure un exon lors de la réaction d'épissage (**Figure 2a et Figure 9**). Pour cela, il suffit en théorie d'empêcher la reconnaissance par le spliceosome de n'importe quel site d'épissage, allant des sites donneurs et accepteurs (5'ss et 3'ss) au BPS ou au PPT, en passant pas les sites exoniques ou introniques activateurs de l'épissage (ESE et ISE respectivement). Ainsi, l'hybridation d'un oligonucléotide sur un site de reconnaissance du spliceosome ou d'un facteur d'épissage empêchera son recrutement, et par la même le bon déroulement de la réaction. Il en résulte un saut de l'exon jouxtant la zone ciblée.

Très étudié sur le modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne, le saut d'exon a aussi été étudié dans d'autres modèles. Il peut être utilisé dans différents buts dont i) l'obtention d'une protéine tronquée mais partiellement fonctionnelle, ii) le blocage d'un site cryptique d'épissage, iii) la réorientation du spliceosome vers l'épissage d'une isoforme d'intérêt ou iv) la perte de fonction d'une protéine dans le cas d'agents pathogènes ou de maladies à caractère dominant (**Figure 9 et Tableau 5**).



**Figure 9 : les applications du saut d'exon**  
D'après (Wilton and Fletcher, 2005).

Maladie	Gène cible	Protéine	Cible	Références sélectionnées
<b><i>Obtention protéine tronquée mais partiellement fonctionnelle</i></b>				
Dystrophie musculaire de Duchenne	<i>Dystrophine</i>	Dystrophine	5'ss, 3'ss, I.E., plusieurs exons de la dystrophine murine et humaine	Goyenvalle et al. (2004), Alter et al. (2006) De Angelis et al. (2002), Aartsma-Rus et al. (2003) Van Deutekom et al. (2007)
<b><i>Blocage sites cryptiques d'épissage</i></b>				
β-Thalassémie	<i>β-globine</i>	β-globine	5'ss, 3'ss, BP, ISE	Sierakowska (1996), Suter (1999), Vacek et al. (2003)
Progeria ( <i>Hutchinson-Gilford</i> )	<i>LMNA</i>	Lamine A	I.E. exon 11	Scaffidi et al. (2005)
Ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>	ATM	I.E exon 55, I.E. exon 8, 5'ss et 3'ss intron 28	Du et al. (2007)
Albinisme oculaire de type I	<i>OAI/GPRI43</i>	OAI	3'ss intron 7	Vetrini et al. (2006)
<b><i>Réorientation épissage vers un isoforme d'intérêt</i></b>				
Cancer	<i>Bcl-X</i>	Bcl-xS et Bcl-xL	5'ss exon spécifique isoforme Bcl-xL	Mercatante et al. (2001, 2002)
Cancer de la prostate	<i>FOLH1</i>	Antigène membranaire spécifique de la prostate	5'ss exon 1, 6 ou 18	Williams et Kole (2006)
Asthme	<i>IL5R-α</i>	Récepteur α à l'IL5	3'ss ou 5'ss exon 9	Karras et al. (2000, 2001)
Inflammation	<i>MyD88</i>	MyD88	5'ss exon 2	Vickers et al. (2006)
Démence frontotemporale et Parkinsonisme lié au chromosome 17	<i>Tau</i>	Tau	5'ss ou 3'ss exon 10	Kalbfuss et al. (2001)
Arthrite Rumhatoïde	<i>TNFRSF1B</i>	Recepteur 2 au TNFα	Exon 7 ou exon 8	Review Aartsma-Rus (2007)
Leucémie	<i>WT1</i>	WT1	I.E. exon 5	Renshaw et al. (2004)
<b><i>Perte de fonction (+/- allèle spécifique)</i></b>				
Athérosclérose	<i>APOB</i>	Apolipoprotéine B	3'ss et BP exon 27	Khoo et al. (2007)
Épidermolyses bulleuse dystrophique	<i>COL7A1</i>	Collagène de type 7	I.E exon 70	Goto et al. (2006)
SIDA	<i>Cyclophiline A</i>	Cyclophiline A	5'ss, 3'ss exon 3 ou exon 4	Liu et al. (2004)
SIDA	<i>Tat / Rev / Nef</i>	Tat / Rev / Rev	5'ss, 3'ss, BP alternatifs	Asparuhova et al. (2007)
Titinopathies	<i>Tnt</i>	Titine	5'ss exons 45, 79, 37, 47	Seeley et al. (2007)

**Tableau 5 : Résumé des applications du saut d'exon.**

I.E. : Intra-exonique ; 5'ss et 3'ss, sites donneurs et accepteurs de l'épissage ; BP : point de branchement ; ISE, inhibiteur intronique de l'épissage. *Adapté de (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007).*

D'une façon générale, hormis dans les cas de recherche de perte de fonction, le respect du cadre ouvert de lecture est particulièrement important. En effet, supprimer un exon dans un ARN messager mature peut entraîner un décalage du cadre ouvert de lecture à la jonction des deux exons nouvellement joints, l'insertion probable d'un codon stop prématuré, et par voie de conséquence une perte totale d'expression protéique. Il est alors parfois nécessaire d'exclure plusieurs exons lors de la réaction d'épissage pour permettre à l'ARN messager de garder intact son cadre ouvert de lecture.

Concernant la dystrophie musculaire de Duchenne, le principe du saut d'exon est de déléter le transcrit d'un exon porteur d'une mutation (souvent non-sens), permettant la production d'une protéine partiellement fonctionnelle, et l'apparition d'une forme atténuée de la maladie, la dystrophie musculaire de Becker. Cette manipulation est rendue possible par la structure de la protéine qui en est issue. Elle est composée d'un domaine de liaison à l'actine en position N-terminale, de 24 répétitions « *spectrine-like* » formant le domaine central, et d'une partie C-terminale responsable de la liaison aux protéines du sarcolemme. Les protéines tronquées dans leur partie interne gardent une activité partielle. Un grand nombre d'études ont fait part de la possibilité de manipuler l'épissage de la dystrophine, d'abord *in vitro*, puis *in vivo* chez la souris mdx, et enfin chez l'Homme (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007) (**Tableau 5**). Un essai clinique a été effectué, et ses résultats publiés récemment (van Deutekom et al., 2007). Dans cette étude, 4 patients porteurs d'une mutation sur l'exon 51 de la dystrophine ont été traités par une injection intramusculaire de 0,8mg d'oligonucléotide ciblant l'exon 51 de la dystrophine. Cet essai de faisabilité démontre la fonctionnalité du saut d'exon chez l'Homme.

Cependant, la formulation des oligonucléotides antisens fait actuellement débat. Si dans leurs phases pré-clinique et clinique, les auteurs ont utilisé un oligonucléotide synthétique chimiquement modifié (2'OMe-PS) sans remarquer d'effet secondaire important, d'autres équipes ont noté que la formulation phosphorotioate était porteuse de toxicité et d'un manque de spécificité (Lebedeva and Stein, 2001). En outre, les oligonucléotides ainsi formulés sont affins à certaines protéines telles que le récepteur à l'EGF (*Endothelial Growth Factor* ; antagonise l'effet de l'EGF ou l'agonise par liaison à son récepteur), le VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*) et son récepteur, le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le CD4 (Cluster de Différenciation 4 ; marqueur lymphocytes T) etc. D'autres modifications chimiques sont possibles (chimies morpholino ou LNA par exemple), mais le type de modifications, voir même d'une façon plus générale l'apport d'oligonucléotides synthétiques résistants aux RNases *versus* l'apport d'un vecteur viral porteur de la cassette d'expression est devenue une question majeure. Premièrement, le catabolisme des antisens synthétiques n'est pas bien connu. Bien qu'il apparaisse qu'ils sont rapidement éliminés de l'organisme receveur (Aartsma-Rus and van Ommen, 2007), la question de leur accumulation confinée reste en suspens. Deuxièmement, comment mentionnée précédemment, leur spécificité semble critiquable. Troisièmement, quand l'injection d'antisens synthétique offre la possibilité d'arrêt de traitement en temps voulu, elle a l'inconvénient de nécessiter l'apport fréquent d'oligonucléotides, contrainte en termes de lourdeur et de coût de traitement. Enfin, leur biodistribution semble limiter leur champ d'application, notamment au niveau du système nerveux central (Hua et al., 2008). Cependant, leur utilisation a l'avantage d'offrir un moyen de correction dans lequel i) la réponse immunitaire contre la capsid d'un vecteur sera inexistante, et ii) l'arrêt du traitement est possible au cas où un effet secondaire serait découvert et/ou un autre traitement disponible.

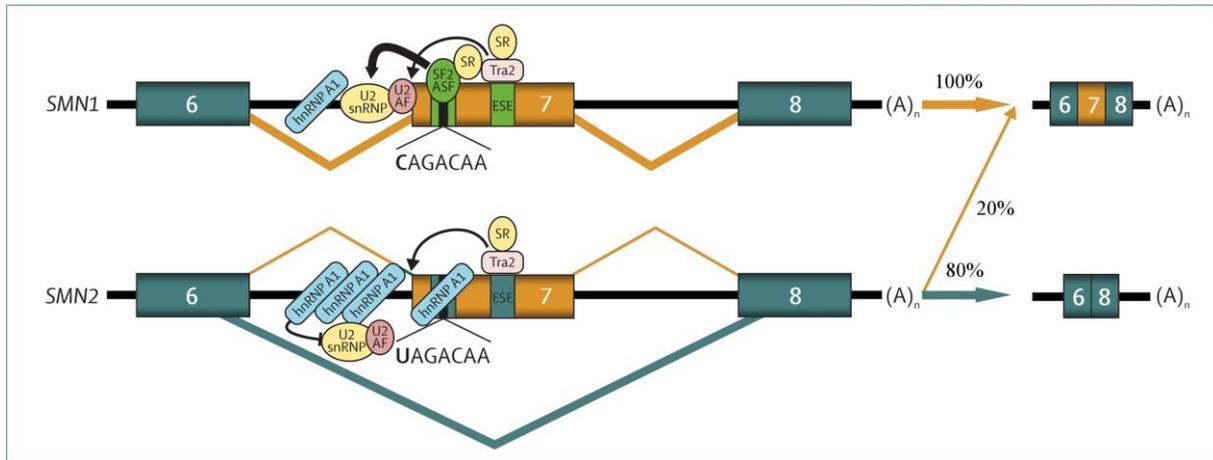
### 2.2.3.2 Inclusion d'exons

#### 2.2.3.2.1 Principe et modèle d'étude

À l'inverse, il est possible de réapprendre au spliceosome la reconnaissance d'un site d'épissage donné. En effet, des mutations sur les sites donneurs, accepteurs, le point de branchement ou encore le PPT engendrent un défaut de reconnaissance de la machinerie d'épissage, ayant pour conséquence le saut de l'exon concerné ou l'activation d'un site cryptique d'épissage. Il en est de même pour les sites activateurs et/ou inhibiteurs de l'épissage, qu'ils soient introniques ou exoniques. Le profil d'épissage qui en résulte est alors aberrant, et la protéine souvent non fonctionnelle. Des études ont montré la possibilité de réapprendre au spliceosome l'épissage correct d'un exon, en recrutant artificiellement des activateurs ou en bloquant la fixation d'inhibiteurs de l'épissage. Ces études ont pour la

plupart été effectuées avec pour modèle l'amyotrophie spinale (ou SMA pour *Spinal Muscular Atrophy*).

Brièvement, l'amyotrophie spinale est une maladie autosomique récessive, caractérisée par une perte progressive des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière, une atrophie des muscles squelettiques, et finalement un profil pathologique généralisé (Lunn and Wang, 2008). Cette maladie est causée par la perte de fonction de la protéine SMN1 (pour *Survival Motor Neuron 1*) (Lefebvre et al., 1995; Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999). Chez l'Homme, il existe naturellement une copie non fonctionnelle de *smn1*, nommée *smn2*, pouvant être dupliquée de multiples fois (Lefebvre et al., 1995). Chez un témoin sain, le gène *smn2* est déficient mais est compensé par la présence de *smn1*. Chez un patient atteint de SMA, le gène *smn2* déficient n'est plus compensé par *smn1*. *Smn2* est une copie presque parfaite de *smn1*, mises à part 11 mutations. Deux mutations sont situées dans la partie codante du gène, toutes deux silencieuses du point de vue du code génétique. La perte d'activité de *smn2* est due à une substitution d'un C par un T en position +6 de l'exon 7 de *smn2* (C6T). Elle provoque non seulement un défaut de recrutement d'un activateur de l'épissage, ASF/SF2 (Cartegni and Krainer, 2002), mais aussi la création d'un site de recrutement de la protéine hnRNP A1, inhibitrice de l'épissage (Kashima and Manley, 2003; Kashima et al., 2007). L'effet antagoniste du recrutement de la hnRNP A1 sur celui de ASF/SF2 (Cartegni et al., 2006) conduit, dans la majorité des cas, un épissage de *smn2* de telle sorte que l'exon 7 est manquant dans l'ARNm, alors que dans une minorité des cas, l'exon 7 est malgré tout inclus (**Figure 10**). Bien que le profil d'épissage soit très majoritairement en défaveur de la production d'une protéine fonctionnelle (Chang et al., 2004; Lorson and Androphy, 2000; Vitte et al., 2007), les ARNm correctement épissés semblent atténuer partiellement la maladie (Gavrilov et al., 1998). En effet, il existe une corrélation entre le nombre de copies de *smn2* et la sévérité phénotypique chez les patients atteints de SMA (Feldkotter et al., 2002; McAndrew et al., 1997).



**Figure 10 :** Le défaut d'inclusion de l'exon 7 de *smn2*.

Dans le cas de SMN1, un ESE contenant une cystine en position +6 de l'exon 7 est reconnu par une protéine ASF/SF2, qui interagit avec la protéine snRNP2 pour exciser l'intron 6. D'autres facteurs d'épissages (dont hTra2β1) déterminent la reconnaissance de l'exon 7 par leur liaison au centre de l'exon 7 et par la création de ponts protéiques *via* des protéines SR. Dans le cas de SMN2, la substitution de la cytosine par une thymine en position +6 de l'exon 7 empêche la liaison de ASF/SF2 et permet la liaison d'un facteur répresseur de l'épissage, hnRNP A1. La liaison de hnRNP A1 empêche la liaison de snRNP2 sur le point de branchement, ce qui résulte, dans la grande majorité des cas, à un saut de l'exon 7. Cependant, dans 20% des cas, l'exon 7 est malgré tout reconnu par le spliceosome, permettant l'inclusion de l'exon. *Adapté de (Lunn and Wang, 2008)*

Il a été montré que redonner sa séquence initiale au site de fixation de ASF/SF2 sur l'exon 7 de *smn2* permettait au spliceosome d'inclure à nouveau cet exon dans l'ARNm (Cartegni and Krainer, 2002). De même, surexprimer hTra2β1 ou SRp30c, activateurs de l'épissage pourvus d'un site de fixation sur l'exon 7 de *smn2*, permet d'améliorer sa reconnaissance par le spliceosome, et de forcer son inclusion (Hofmann et al., 2000; Young et al., 2002). Ces trois études confirment qu'un défaut de prise en charge par le spliceosome est responsable du saut de l'exon 7 de *smn2*, et montrent qu'à l'inverse, il est possible de réapprendre au spliceosome l'épissage de cet exon.

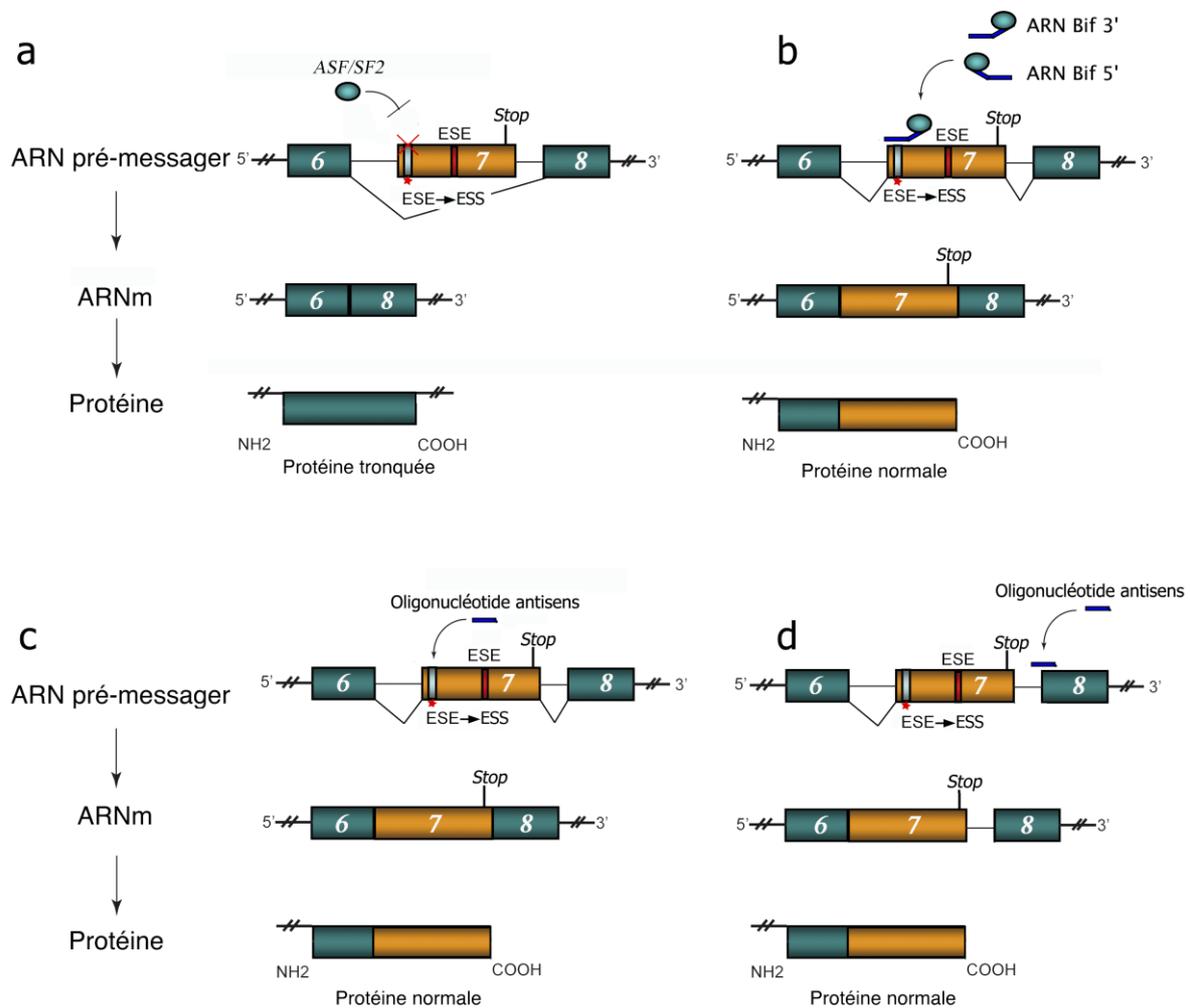
C'est à partir de ces observations que l'inclusion d'exon a débuté, avec pour objectif de faciliter la reconnaissance des signaux d'épissage par le spliceosome. Trois stratégies d'inclusion d'exon par oligonucléotide ont été testées dans le modèle SMA (**Figure 11**). La première utilise des ARN bifonctionnels, pourvus d'un domaine de liaison et d'une « queue SR », dont le rôle est de recruter des activateurs de l'épissage (**Figure 11b**). La seconde utilise des oligonucléotides antisens, dépourvus de cette queue SR, totalement complémentaires de la zone à cibler. Dans ce cas, le but est de cibler une séquence inhibitrice de l'épissage (**Figure 11c**). Enfin, la troisième possibilité profite i) du fait que le codon stop

est situé sur l'exon 7 de *smn2* et que le dernier exon est non codant, et ii) du fait que bloquer l'inclusion de l'exon 8 revient à favoriser celle de l'exon 7. Les auteurs de ces études se sont donc servi d'un oligonucléotide ciblant un site d'épissage de l'exon 8 (**Figure 11d**). Finalement, cette stratégie se rapproche du saut d'exon, plus particulièrement des possibilités évoquées dans le paragraphe précédent visant à réorienter l'épissage vers un isoforme d'intérêt.

#### 2.2.3.2.2 Les ARN bifonctionnels

Des ARN bifonctionnels, capables de diriger le spliceosome vers une réinclusion de l'exon 7 de *smn2*, ont été créés dans deux conformations différentes. Un ARN bifonctionnel 5' est orienté de telle sorte qu'un domaine de liaison à l'ARN est placé en 5' de la molécule (Baughan et al., 2006; Cartegni and Krainer, 2003), alors que dans le cas d'un ARN bifonctionnel 3', ce domaine de liaison est en 3' (**Figure 11b**) (Baughan et al., 2006; Marquis et al., 2007; Skordis et al., 2003). De plus, une quantité variable de sites de fixation (Cartegni and Krainer, 2003) et de différentes protéines activatrices de l'épissage (Baughan et al., 2006; Marquis et al., 2007) a été testée, de même que l'effet adjuvant du snRNAU7 en 3' de l'ARN bifonctionnel (Marquis et al., 2008; Marquis et al., 2007; Meyer et al., 2008). Enfin, deux formulations de l'oligonucléotide ont été testées, une production sous forme d'oligonucléotide synthétique chimiquement modifié (Cartegni and Krainer, 2003; Skordis et al., 2003) et une vectorisation virale permettant la production *in situ* de la molécule (Baughan et al., 2006; Marquis et al., 2008; Marquis et al., 2007; Meyer et al., 2008). Les résultats obtenus dans les différentes études détaillant la mise au point des ARN bifonctionnels sont résumés dans le **tableau 6**. Brièvement, la faisabilité et la robustesse de cette technique ont pu être démontrés au niveau moléculaire comme au niveau protéique. Des taux d'inclusion de 94% ont été obtenus en ajoutant le snRNA U7 en aval de l'ARN bifonctionnel (Marquis et al., 2007). La faisabilité de l'inclusion d'exon à l'aide d'ARN bifonctionnel a été démontrée *in vivo*, chez des souris SMA transgéniques. Cette étude montre une amélioration phénotypique significative chez les souris SMA transgéniques exprimant l'ARN bifonctionnel par rapport aux souris SMA non traitées (Meyer et al., 2008). De plus, un système de régulation a été mis

au point *in vitro*, utilisant le transactivateur TetR-KRAB, et permet, de façon répétitive et dose dépendante, de réguler l'expression de l'ARN bifonctionnel (Marquis et al., 2008).



**Figure 11 : L'inclusion d'exon à l'aide d'oligonucléotides.**

Plusieurs possibilités d'inclusion d'exon existent dans le modèle SMA. **a** : Dans la SMA, la mutation d'une cytosine par une thymine dans l'exon 7 empêche la fixation correcte d'un activateur de l'épissage, ASF/SF2. Il en résulte un saut de l'exon, et une protéine tronquée. **b** : inclusion d'exon par ARN bifonctionnels. L'apport d'ARN bifonctionnels 5' et 3' permet le recrutement de facteurs activateurs de l'épissage, une meilleure reconnaissance et une réintroduction de l'exon par le spliceosome. **c** : Forcer l'inclusion de l'exon est aussi possible en bloquant l'inhibiteur de l'épissage créé par la mutation. **d** : L'inclusion de l'exon 7 au détriment de l'exon 8 est possible, et résulte en la production d'une protéine fonctionnelle.

*ESE* : activateur exonique de l'épissage ; *ESS* : inhibiteur exonique de l'épissage ; *ARN Bif 5' et 3'* : ARN bifonctionnels 5' et 3'. *Adapté de (Wood et al., 2007)*

Étude	Orientation	Domaine de liaison		Protéine recrutée		Formulation		Efficacité maximale	Détection protéine
		Longueur (bases)	Cible sur SMN2	Protéine recrutée	Séquence recrutement	Nombre de répétitions	Vectorisation		
<u>Cartegni et al.</u>	5'	12	hnRNP A1	ASF/SF2	NC	10	Oligonucléotides synthétiques	60% (épissage <i>in vitro</i> )	-
<u>Skordis et al.</u>	3'	15	hnRNP A1	ASF/SF2	GGAGGAC	4	Oligonucléotides synthétiques	84%	Immunofluorescence
<u>Baughan et al.</u>	5'		hnRNP A1	ASF/SF2	CACACGA	3	Plasmide d'expression + vecteur AAV	-	Western blot Immunofluorescence
			hnRNP A1	hTra2β1	GAAGGAGG	3			
				SC35	CCGGGGTG	3			
		20		ASF/SF2	CACACGA	3			
	3'		hnRNP A1	hTra2β1	GAAGGAGG	3			
				SC35	CCGGGGTG	3			
<u>Marquis et al.</u>		17	hnRNP A1	ASF/SF2	GAAGAAC	4	Plasmide + vecteur lentiviral	65%	Western blot Immunofluorescence
				ASF/SF2	GAAGAAC	4	snRNAU7 Opt	94%	
				ASF/SF2	CACACGA	3	snRNAU7 Opt	4%	
	3'			SRp40	TCACAGG	3	snRNAU7 Opt	1%	
		20	ISS25	SRp55	TGCGTC	4	snRNAU7 Opt	42%	
				SC35	GGCCCCCTG	3	snRNAU7 Opt	1%	
				TIA-1	GCCTTCATTTTGT CTTTTTTAA	1	snRNAU7 Opt	1%	

**Tableau 6 : Bilan de l'utilisation des ARN bifonctionnels dans le modèle SMA.**

Les séquences sont données de 5' en 3'. NC : Non Communiqué

2.2.3.2.3 Utilisation d'oligonucléotides antisens sans queue SR

En se basant sur des observations faites lors de la manipulation des ARN bifonctionnels, montrant que le ciblage du site recruteur de la hnRNP A1 présent sur l'exon 7 de *smn2* augmentait l'efficacité d'inclusion de l'exon, l'équipe d'Adrian Krainer a étudié la possibilité d'utiliser des oligonucléotides antisens dépourvus de queue SR. En effet, les domaines de liaison des ARN bifonctionnels sont, s'ils ciblent un site recruteur d'une protéine inhibitrice de l'épissage, capables d'entraîner une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 de *smn2*, avec une efficacité de 40% *in vitro* (Cartegni and Krainer, 2003). La fixation de l'oligonucléotide antisens sur ces séquences empêche le recrutement des facteurs, et facilite donc l'inclusion de l'exon (**Figure 11c**).

Deux études prouvent la pertinence de cette possibilité. Dans la première, les auteurs ont cartographié *in vitro* et en cellules immortalisées de façon très fine les séquences de l'exon sur lesquelles les oligonucléotides antisens permettent d'inclure l'exon avec le plus d'efficacité. Il résulte de cette étude deux zones à activité inhibitrice, dont le ciblage permet une réinclusion de l'exon avec des efficacités atteignant 70% *in vitro* et 96% en cellules 293 (Hua et al., 2007). Dans la seconde étude, les auteurs, continuant leur cartographie, ont montré l'existence, sur l'intron 7, de sites de recrutement de deux protéines inhibitrices de l'épissage, hnRNP A1 et A2. Le ciblage de ces zones à l'aide d'oligonucléotides antisens permet l'inclusion de l'exon 7 de façon très efficace (jusqu'à 99% d'inclusion en cellules 293). Finalement, dans cette étude, la possibilité d'inclusion forcée d'exon est démontrée *in vivo*, après administration intraveineuse de 25mg/kg d'oligonucléotide antisens chimiquement modifiés. Les auteurs ont obtenu des taux d'inclusion de 70% dans les reins, de 90% dans le foie, et de 50% dans le muscle (Hua et al., 2008).

#### 2.2.3.2.4 Blocage de l'inclusion de l'exon suivant

Une troisième possibilité d'inclusion forcée d'un exon consiste à bloquer l'inclusion de l'exon suivant (**Figure 11d**). Dans le modèle SMA, le codon stop est situé sur l'exon 7 de *smn2*. L'exon 8 est non codant. Bloquer l'épissage de l'exon 8 ne devrait donc pas altérer le profil protéique qui en est issu. Au niveau moléculaire, les études dans ce domaine montrent que i) le ciblage du point de branchement et du polypyrimidine tract de l'intron 7 n'ont pas d'effet sur l'inclusion de l'exon 7 alors que ii) le ciblage du site accepteur de l'épissage situé à la jonction de l'intron 7 et de l'exon 8 permet une inclusion de l'exon 7 avec une efficacité de 50% par transfection d'oligonucléotides synthétiques (Lim and Hertel, 2001), et de 73% lors de leur expression conjointe avec le snRNAU7 sous contrôle d'un promoteur de type RNA Pol II (Madocsai et al., 2005). De plus, une augmentation de 40% de la quantité de protéine SMN2 a été mesurée en présence du snRNA U7 (Madocsai et al., 2005). Cependant, une étude récente, testant ces antisens comment molécules adjuvantes pour le *trans*-épissage, a montré que leur présence ne permettait pas de voir réapparaître de protéine fonctionnelle chez la souris SMA (Coady et al., 2008). Très récemment aussi, une équipe a montré qu'il était possible d'utiliser des ARN bifonctionnels pour recruter des inhibiteurs de l'épissage sur l'exon 8 de *smn2* et ainsi favoriser l'inclusion de l'exon 7. Dans cette étude, les auteurs, en plus de l'oligonucléotide antisens, ajoutent une queue capable de recruter des hnRNP A1. Le recrutement de cette protéine dans l'environnement de l'exon 8 a pour effet d'augmenter l'inclusion de l'exon 7 *in vitro* et *in vivo* (Dickson et al., 2008).

#### 2.2.3.3 Le trans-épissage

Le *trans*-épissage est une autre possibilité de réparation d'un ARN pré-messager. Contrairement aux stratégies d'inclusion et d'exclusion d'exon, le *trans*-épissage passe par une reprogrammation de l'ARN pré-messager cible. Ici, l'inclusion de séquence exogène dans l'ARN ciblé est nécessaire.

2.2.3.3.1 Le trans-épissage naturel

Un épissage peut parfois avoir lieu entre des exons présents sur des ARN pré-messagers distincts. Ce phénomène est appelé *trans-épissage*. Il a tout d'abord été découvert chez les trypanosomes (Sutton and Boothroyd, 1986), et ensuite dans des organismes plus complexes tels que le ver *Caenorhabditis elegans* (Bektesh and Hirsh, 1988). Chez *Caenorhabditis elegans* justement, il apparaît que la plupart des messagers matures commencent par la même séquence de 22 nucléotides, appelée « splice leader », ajoutée par *trans-épissage*. Cette séquence joue un rôle dans l'initiation de la traduction, la localisation et la stabilité des ARN messagers (Blumenthal, 2005).

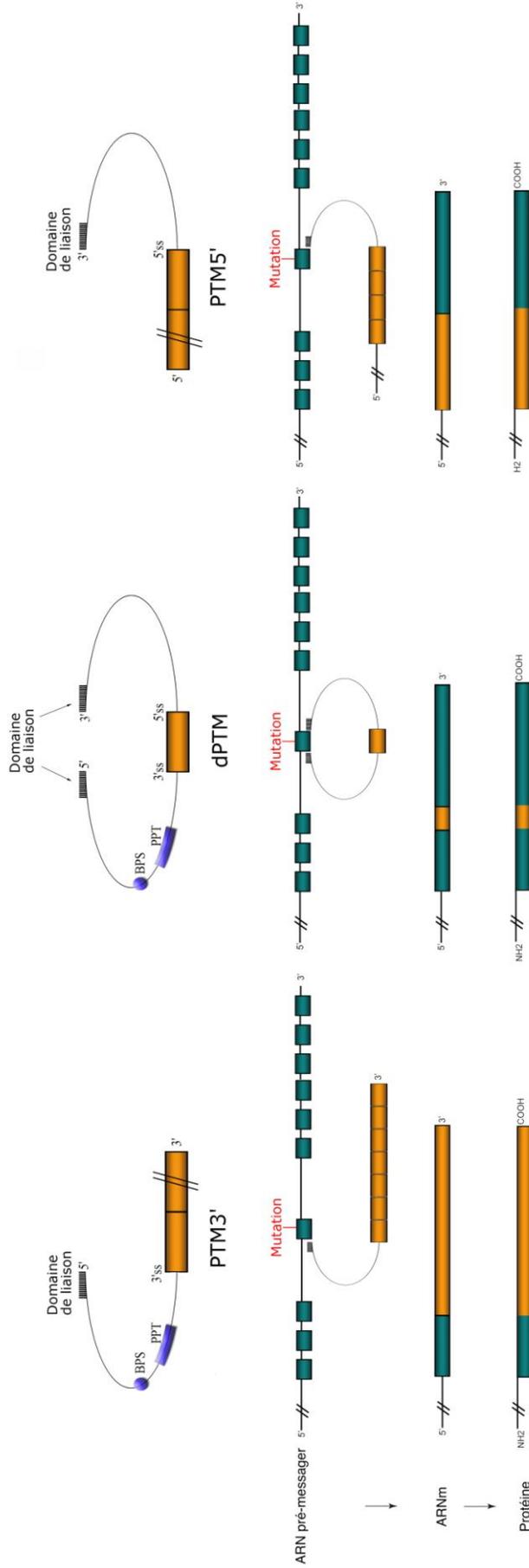
Le *trans-épissage* a ensuite été mis en évidence *in vivo* chez les mammifères, entre des ARN viraux et cellulaires de cellules infectées par le virus SV40, le VIH et l'adénovirus (Caudevilla et al., 2001; Eul et al., 1995; Kikumori et al., 2002). De plus, plusieurs exemples de réactions de *trans-épissage* se produisant entre différents ARN pré-messagers cellulaires ont été décrits (Mayer and Floeter-Winter, 2005). Cette réaction, qu'elle ait lieu chez les eucaryotes inférieurs ou chez les mammifères, est conduite par le spliceosome, de la même façon que la réaction de *cis-épissage* détaillée dans le **chapitre 2.2.2.2**. Cependant, dans la plupart des exemples de *trans-épissage* chez les mammifères, le rôle fonctionnel du *trans-épissage* n'est pas clair. De plus, dans tous ces exemples, les ARN pré-messagers sont également engagés dans un processus de *cis-épissage*, suggérant que le *trans-épissage* observé pourrait n'être qu'un bruit de fond, résultant de l'appariement rare de sites d'épissage présents sur des ARN pré-messagers distincts, sans réelle fonction (Maniatis and Tasic, 2002; Mayer and Floeter-Winter, 2005). Une seule équipe a récemment mis en évidence une réaction de *trans-épissage* naturelle codant une protéine à effet anti-apoptotique dans des cellules normales (Li et al., 2008a).

#### 2.2.3.3.2 Le trans-épissage, outil de thérapie génique

Quoiqu'il en soit, l'existence d'un phénomène naturel de *trans*-épissage dans les cellules de mammifères en général et humaines en particulier a ouvert la porte à une nouvelle possibilité de thérapie génique utilisant le *trans*-épissage comme outil de reprogrammation d'ARN pré-messagers défectueux dans divers modèles pathologiques. Ainsi, la production dans la cellule de PTM ou d'ATM (pour *Pre-Trans-splicing Molecule* ou *Artificial Trans-splicing Molecule*, respectivement) capables de s'hybrider à la cible d'intérêt permet, dans une réaction conduite par le spliceosome, de remplacer une séquence mutante par une séquence normale, redonnant à la cellule la fonction protéique qu'elle avait perdue.

##### 2.2.3.3.2.1 Structure des PTM

Deux types de PTM ont à ce jour été décrits fonctionnels pour le *trans*-épissage. Un PTM 5' est composé i) d'une séquence codante comprenant l'exon à reprogrammer et de tous les exons en amont de cet exon, ii) d'un site donneur d'épissage et iii) d'un domaine de liaison responsable de la spécificité d'action de la molécule (Mansfield et al., 2003) (**Figure 12**). Un PTM 3' quant à lui est composé i) d'une séquence codante comprenant l'exon à reprogrammer et de tous les exons en aval de cet exon, ii) d'un intron porteur des séquences BPS, PPT et d'un site accepteur de l'épissage et iii) d'un domaine de liaison responsable de la spécificité d'action de la molécule (Puttaraju et al., 1999) (**Figure 12**). Un troisième type de PTM serait théoriquement capable de se *trans*-épisser, mais n'a, à ce jour, fait l'objet d'aucune étude publiée. Il s'agit du double PTM (dPTM), composé i) de l'exon à remplacer, ii) des séquences introniques situées sur les PTM 5' et 3' et iii) de 2 domaines de liaisons permettant la liaison du dPTM de part et d'autre de l'exon à reprogrammer (**Figure 12**). Il serait en théorie capable de reprogrammer un exon interne sans nécessiter l'apport des exons en amont (PTM 5') ou en aval (PTM 3') de l'exon à reprogrammer (pour review, (Garcia-Blanco, 2003; Mansfield et al., 2004; Yang and Walsh, 2005).



**Figure 12 :** Les réactions de trans-épissage et l'architecture des PTM

Les PTM5' sont constitués d'une partie exonique comprenant l'exon à remplacer et tous les exons situés en son amont, d'un site 5'ss et d'un domaine de liaison conférant sa spécificité d'action à la molécule. Les PTM3' sont constitués d'une partie exonique comprenant l'exon à remplacer et des exons situés en son aval, d'un site 3'ss, d'une séquence intronique comprenant le BPS et le PPT, et d'un domaine de liaison spécifique de la séquence à cibler. Les doubles PTM (dPTM) quant à eux sont composés des séquences introniques des PTM5' et des PTM3', et d'une séquence codante constituée uniquement de l'exon à reprogrammer.

#### 2.2.3.3.2.2 Résultats obtenus dans la littérature

Plusieurs applications du *trans*-épissage ont été rapportées. Elles vont de la reprogrammation de transcrits défectueux dans divers modèles de maladies génétiques à l'étude du profil d'expression de certains gènes *in vivo* en passant par l'expression de toxines en cellule cancéreuse. La plupart du temps, les auteurs ont commencé leur étude en testant la faisabilité du *trans*-épissage sur un minigène artificiel. Dans ce cas, l'exon à reprogrammer et les introns l'entourant sont clonés dans un plasmide et cotransfectés avec le PTM dans des cellules en culture. Cela permet d'isoler le ou les PTM les plus efficaces, et de travailler facilement sur l'amélioration du système. Une fois l'étude de faisabilité effectuée, les études s'orientent vers la reprogrammation de transcrits exprimés à partir du gène endogène en cellules en culture voir *in vivo* chez le rongeur.

Dans les modèles de maladies génétiques, le *trans*-épissage a été étudié dans les modèles de mucoviscidose (Liu et al., 2002; Liu et al., 2005b; Mansfield et al., 2003; Mansfield et al., 2000; Puttaraju et al., 2001), de l'hémophilie A (Chao et al., 2003), de démence frontotemporale avec Parkinsonisme (Rodriguez-Martin et al., 2005), d'immunodéficiences (Tahara et al., 2004; Zayed et al., 2007), de SMA (Coady et al., 2008; Coady et al., 2007) et de dystrophie myotonique (Chen et al., 2008a). Je ne détaillerai pas ici chaque étude, mais brièvement, en utilisant des PTM de différentes natures et structures, les diverses équipes ont réussi à reprogrammer les ARN pré-messagers en cause *in vitro* en cellules en culture, puis *in vivo* chez le rongeur, à l'aide de PTM 5' et/ou de PTM 3'. Les dPTM n'ont jamais fait l'objet d'aucune publication. Les PTM 5' n'ont fait l'objet que d'une seule étude détaillée (Mansfield et al., 2003), alors que les PTM 3' ont fait l'objet de toute l'attention. De belles réussites sont d'ailleurs à noter, avec une correction partielle de cellules issues de patients atteints de la mucoviscidose transplantées chez la souris (Liu et al., 2002), avec une correction phénotypique de souris hémophiles par reprogrammation du facteur VIII (Chao et al., 2003), avec une restauration partielle des fonctions immunitaires de souris atteintes d'immunodéficiences liées au CD40 ligand (Tahara et al., 2004), et avec une restauration de la protéine SMN dans le système nerveux central de souris SMA (Coady et al., 2008).

Dans les stratégies anticancéreuses, l'objectif est différent. Il s'agit ici d'apporter une molécule toxique dans la cellule en ciblant par exemple un gène surexprimé dans les cancers du poumon (BhCG6 pour *β subunit of human chorionic gonadotropin gene 6*) avec un PTM porteur de la sous-unité A de la toxine diphtérique (DT-A pour *diphtheria toxin subunit A*) (Puttaraju et al., 1999). D'autres études montrent la possibilité d'apporter un gène toxique découpé en deux morceaux, et de faire réagir les deux morceaux d'ARN qui en sont issus pour permettre la production d'une protéine toxique. D'une certaine façon, cela revient à faire réagir un PTM 5' avec un PTM 3', tous deux apportés dans la cellule, pour former une séquence codante complète. Cette technique a été appelée STS (pour *Segmental Trans-Splicing*). Elle permet l'apport de gènes trop larges pour être encapsidés dans des particules virales, et pourrait d'ailleurs facilement être transposable aux techniques de transfert de gène. Cette possibilité a été étudiée *in vivo* chez la souris pour apporter les gènes de l' $\alpha$ -cobratoxine (facteur neurotoxique) et de la Shigatoxine (facteur pro-apoptotique) (Nakayama et al., 2005; Pergolizzi et al., 2003).

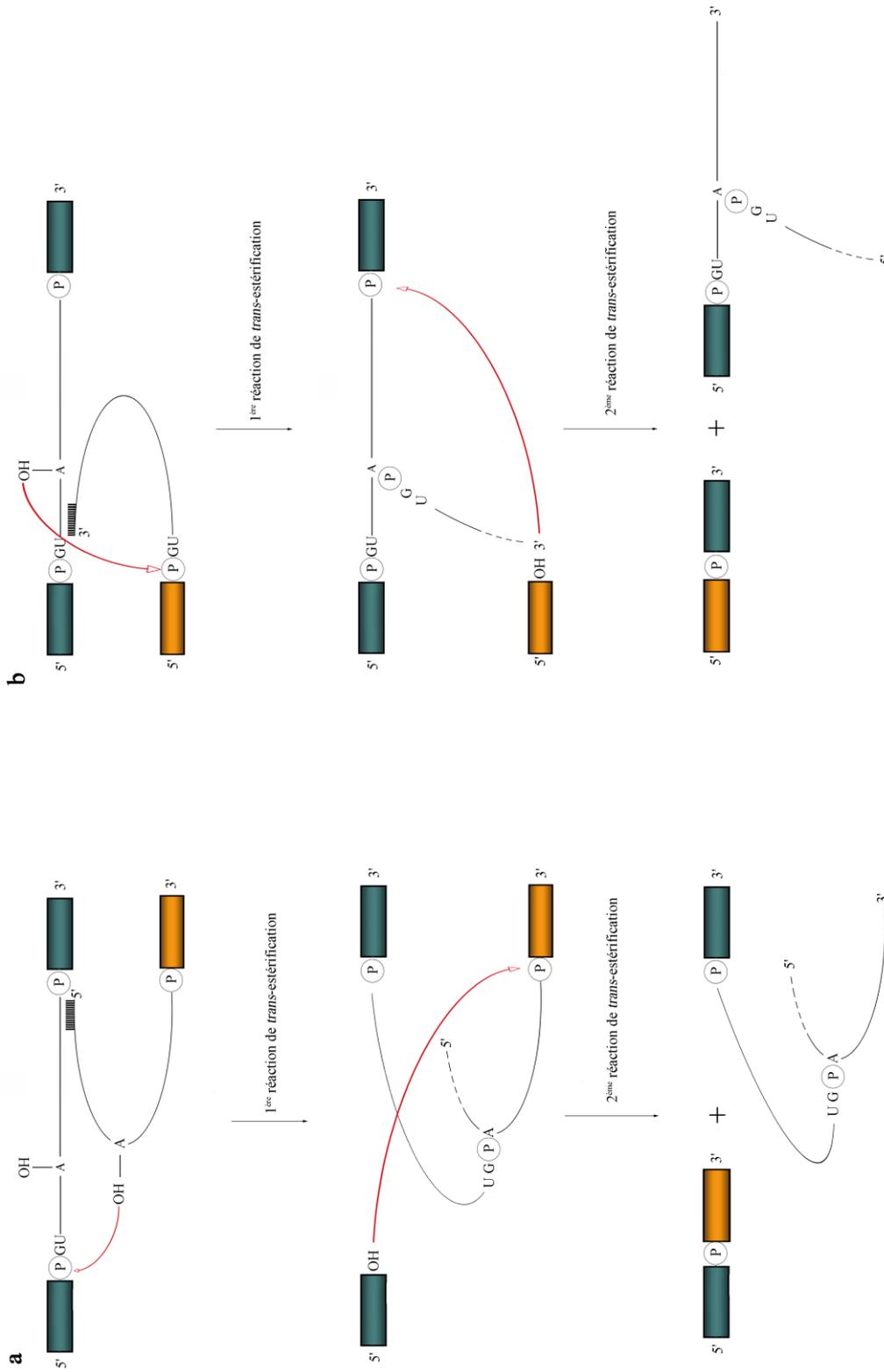
Enfin, tracer le profil d'expression d'un gène est possible par *trans*-épissage. Une étude donne la preuve du concept, traçant celui d'un minigène porteur de séquences exoniques et introniques issues du Papillomavirus de type 16. En faisant agir un PTM 3' spécifique de ces séquences et porteur de la partie 3' du gène de la *Renilla* Luciferase comme gène rapporteur, les auteurs ont été capables, chez des souris vivantes, de visualiser le profil d'expression du minigène (Bhaumik et al., 2004). Une autre étude généralise cette approche à d'autres transcrits, et montre sa viabilité, malgré une efficacité de réaction variable en fonction du domaine de liaison utilisé (Walls et al., 2008).

#### **2.2.3.3.2.3 Principe de la réaction de trans-épissage**

Comme pour la réaction de *cis*-épissage, le *trans*-épissage se déroule en deux étapes, nécessitant deux réactions de *trans*-estérifications successives (**Figure 13**). Dans le cas d'un PTM 5', la première réaction de *trans*-estérification a lieu entre le BPS situé sur la cible et le site 5'ss présent sur le PTM. Cette réaction libère alors un groupe hydroxyle sur le PTM, qui va attaquer le site 3'ss de la cible. La séquence exonique du PTM est alors liée avec celle de la cible. Dans le cas d'un PTM 3', la réaction est exactement inverse : la première réaction de *trans*-estérification a lieu entre le BPS du PTM et le site 5'ss de l'ARN pré-messager, alors que la seconde a lieu entre le site 5'ss de la cible et le site 3'ss du PTM. Ici aussi, la séquence exonique du PTM se lie alors avec celle de l'ARN pré-messager à reprogrammer. La réaction de *trans*-épissage à l'aide de dPTM ferait, quant à elle, intervenir les deux mécanismes à la fois. La structure en lasso libérée suite à l'excision de l'intron dans les réactions de *cis*-épissage n'a quant à elle plus la même forme, on parle de structure en Y (Garcia-Blanco, 2003).

#### **2.2.3.3.2.4 Implication du spliceosome et de sa liaison aux sites d'épissage du PTM**

Le spliceosome étant responsable du bon fonctionnement de la réaction, son recrutement sur le PTM est essentiel. Le PTM 5' ne contient qu'un site d'épissage consensuel, le site donneur d'épissage. Sur le PTM 5' vient donc se lier la snRNP U1. Le PTM 3', quant à lui, est porteur des séquences BPS, PPT et 3'ss. Il se lie aux protéines U2AF<sup>65/35</sup>, à la protéine SF1, puis à la snRNP U2. Finalement, le dPTM est porteur de toutes les séquences consensuelles d'épissage et se lie à tous les composants du spliceosome (Garcia-Blanco, 2003; Mansfield et al., 2004; Yang and Walsh, 2005).



**Figure 13 : Les réactions de trans-épissage à l'aide des PTM 5' et 3'**  
**a** : réaction de trans-épissage à l'aide des PTM 3' ; **b** : réaction de trans-épissage à l'aide des PTM 5'

Les composants du spliceosome ne se lient pas de façon isolée mais faisant appel à d'autres facteurs pour définir le lieu d'épissage (Cf. **chapitre 2.2.2.2.4**), la « définition d'exon » du PTM devient alors importante. Un élément allant dans ce sens est donné dans une étude dans laquelle les auteurs ajoutent un intron dans la séquence codante d'un PTM5'. Le PTM devra alors non seulement se *trans*-épisser avec la cible, mais aussi se *cis*-épisser. Dans ce modèle, un minigène Lac Z, l'ajout de l'intron dans le PTM 5' résulte en une augmentation de 65 fois de l'efficacité de *trans*-épissage, puisque ajouter des sites d'épissage dans le PTM revient à favoriser la définition de sa partie exonique et sa liaison avec les composants du spliceosome (Mansfield et al., 2003). Cependant, les contraintes liées à l'ajout d'un intron dans la séquence codante du PTM, que ce soit sur le plan de la taille du PTM ou du bon déroulement de l'épissage de l'intron supplémentaire, n'encouragent pas à son utilisation.

#### **2.2.3.3.2.5 Liaison du spliceosome sur la cible à reprogrammer**

Le spliceosome pourra se lier sur les sites d'épissage de la cible. Sa liaison à la cible est elle aussi extrêmement importante, mais peut poser problème. Par exemple, dans le cas des PTM 5', il est nécessaire que les protéines U2AF<sup>65/35</sup>, SF1 et snRNPU2 se lient au PPT, 3'ss et BPS. Cependant, si une snRNP U1 se lie sur le site 5'ss de l'exon à remplacer, alors le spliceosome catalysera probablement une réaction de *cis*-épissage, malgré la bonne liaison d'une autre snRNP U1 sur le PTM5'. Il en est de même avec les PTM3' et les dPTM. En résumé, il existe une compétition entre le PTM et sa cible pour la reconnaissance et la prise en charge par le spliceosome. D'une façon générale, l'élément le plus facilement reconnu sera le plus souvent intégré dans la molécule d'ARN messenger mature. C'est pourquoi les sites d'épissage présents sur les PTM sont, dans toutes les études, aussi proches que possible des séquences consensus.

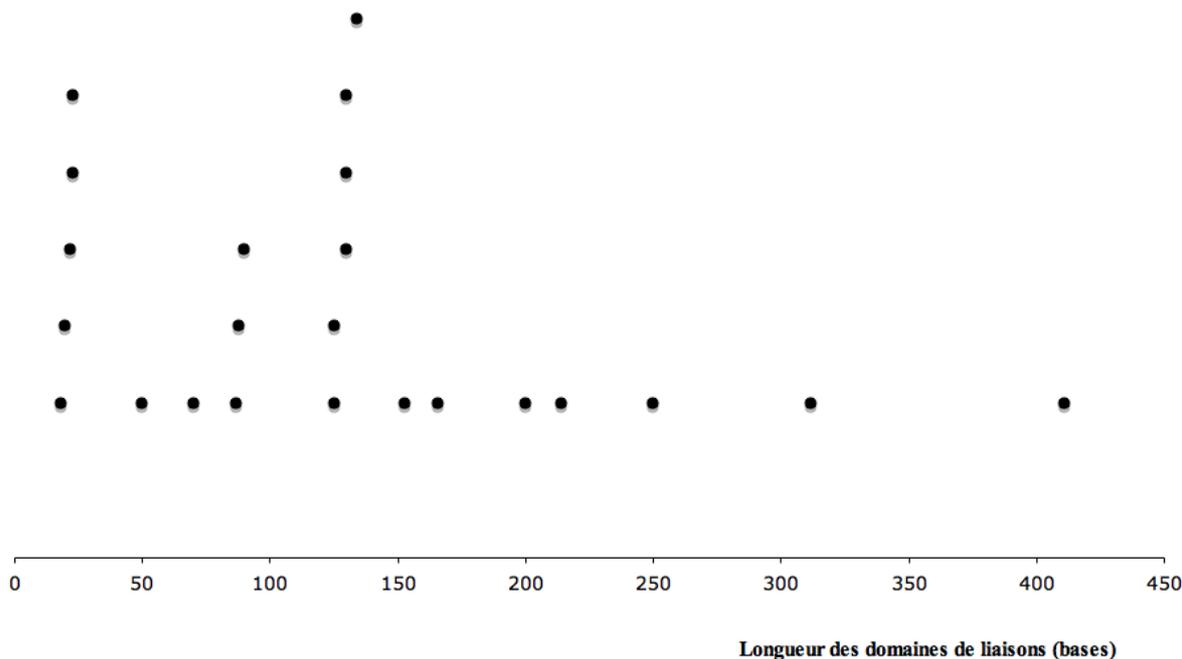
Enfin, de la même façon que les oligonucléotides antisens sont utilisés dans des stratégies de saut d'exon en bloquant l'accès des sites d'épissage au spliceosome, se servir du domaine de liaison pour bloquer un site d'épissage sur la cible paraît être un bon moyen de bloquer sa reconnaissance par le spliceosome et de favoriser celle du PTM (Mansfield et al.,

2003; Puttaraju et al., 1999). Une équipe a d'ailleurs récemment montré qu'inhiber l'épissage de l'exon en aval de l'exon à reprogrammer augmentait l'efficacité de *trans*-épissage (Coady et al., 2008). En effet, lorsque les PTM s'hybrident sur un site d'épissage de la cible, le risque est que le spliceosome ne choisisse pas le PTM comme voie alternative, mais préfère l'exon suivant sur la cible. Il résulte de ce choix un saut de l'exon à reprogrammer, mais pas de *trans*-épissage. En inhibant l'épissage de l'exon 8 de *smn2*, les auteurs ont été capables d'augmenter le niveau de protéines SMN dans des fibroblastes primaires de patients SMA et dans le système nerveux central de souris transgéniques (Coady et al., 2008).

#### **2.2.3.3.2.6 Les domaines liaisons, l'efficacité et la spécificité de la réaction**

##### **2.2.3.3.2.6.1 La longueur du domaine de liaison**

Même si chaque modèle d'étude comporte des caractéristiques qui lui sont propres, notamment sur le plan de l'accessibilité de la cible et de la longueur des domaines de liaisons utilisés, des généralités ressortent sur l'architecture des PTM. Les domaines de liaisons apparaissent être des éléments cruciaux pour le bon déroulement de la réaction. La longueur du domaine de liaison et l'accessibilité de la cible sont des éléments importants. Il sera toujours plus facile de se lier à une cible ne présentant pas une structure secondaire importante. Concernant la longueur du domaine de liaison, des longueurs de quelques dizaines à quelques centaines de paires de base représentent la norme. Il a été montré qu'un domaine de liaison trop court ne permettait qu'une efficacité médiocre du PTM, probablement parce que le PTM pourra se lier facilement à d'autres transcrits de façon aspécifique (Puttaraju et al., 2001). De même, un domaine de liaison trop grand ne donnera pas au PTM une efficacité importante, probablement en partie parce qu'il prendra une structure secondaire plus ou moins stable (Puttaraju et al., 2001). Cependant, en cherchant à généraliser les longueurs utilisées au cours des études, nous nous rendons compte que la distribution de la longueur des domaines de liaison est relativement homogène, hormis pour 3 zones avec lesquelles plusieurs équipes ont choisi de travailler (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Distribution des longueurs des domaines de liaison utilisés dans les précédentes études  
1 point représente un domaine de liaison publié

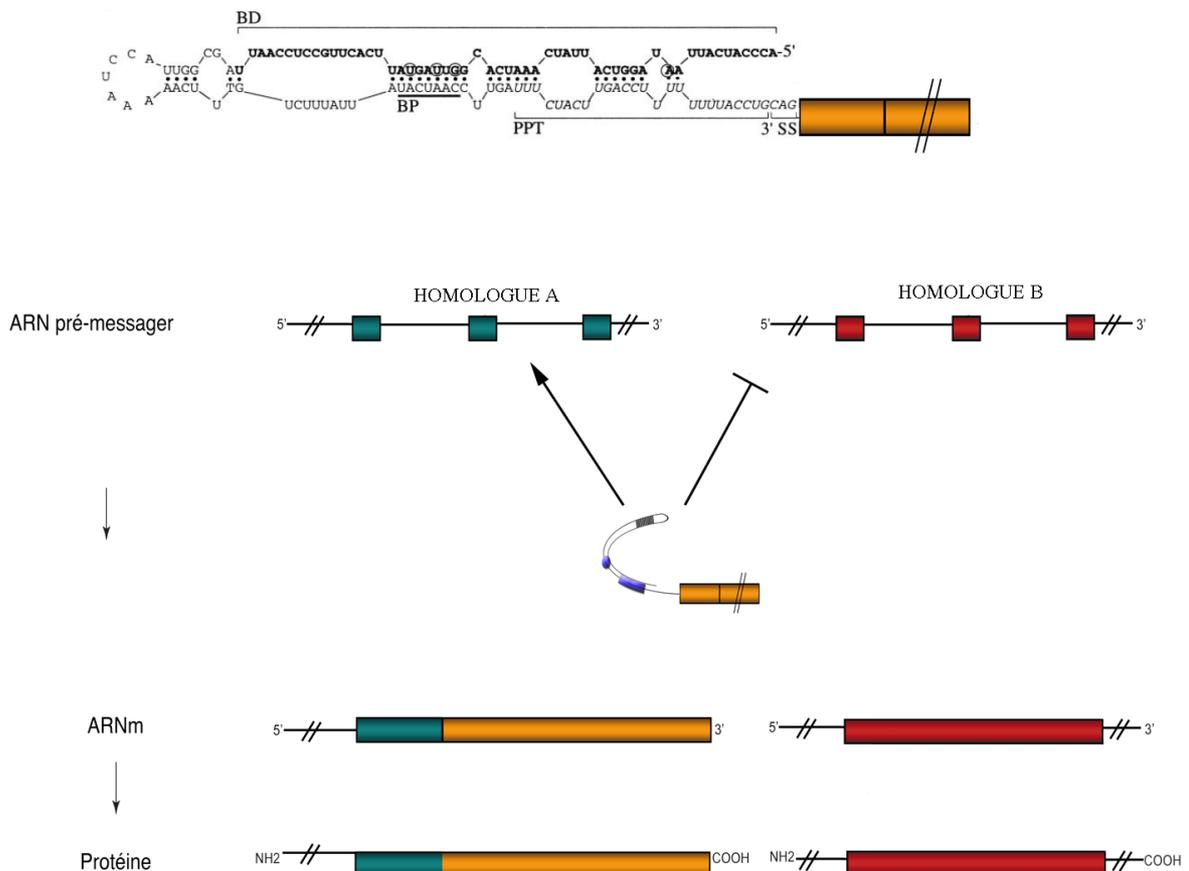
#### 2.2.3.3.2.6.2 La structure secondaire du domaine de liaison

Les domaines de liaisons étant les éléments responsables de la spécificité d'action du PTM, travailler la relation entre leur structure et leur conformation 2D est primordial. Deux études font part de la possibilité d'augmenter la spécificité du PTM en créant un PTM dont la partie intronique est capable de se replier sur elle-même si le PTM ne trouve pas sa cible, et de se déplier lorsqu'il la rencontre, en jouant sur la stabilité de l'hybridation (Mansfield et al., 2000; Puttaraju et al., 1999). Cette structure est appelée « boucle de sécurité » (ou *safety stem*) (**Figure 15**). Elle permet d'augmenter la spécificité du PTM, mais réduit son efficacité (Mansfield et al., 2000; Puttaraju et al., 1999). Cependant, si un PTM très efficace était isolé, alors la question de spécificité deviendrait importante, et créer cette structure secondaire serait possible, même si l'efficacité est quelque peu réduite. Cette possibilité devient encore plus importante si le transcrit à reprogrammer est issu d'une famille de gènes homologues. Elle

permettrait en théorie d'empêcher le PTM d'agir sur les transcrits issus des autres gènes de la famille par exemple (**Figure 15**).

D'une manière générale, la structure secondaire de l'intron du PTM ne devra pas être trop en la défaveur de sa réactivité. Un intron totalement refermé sur lui-même ne serait plus apte à se rouvrir lors de sa rencontre avec la cible, ce qui provoquerait un manque total d'efficacité. C'est pourquoi des études bioinformatiques doivent être menées pour évaluer l'état de repliement de la zone intronique du PTM.

En résumé, travailler sur le domaine de liaison apparaît, au fil des études publiées, être l'élément le plus important dans la construction des PTM. La plupart du temps, de nombreux domaines de liaison sont testés pour isoler un PTM efficace, même si la publication ne décrit parfois l'activité que d'un seul d'entre eux. La société Intronn Inc (Gaithersburg, USA, <http://www.virxsys.com/>) a d'ailleurs développé un système grâce auquel un test à haut débit des domaines de liaison est possible par la construction d'un minigène GFP porteur de l'intron à cibler. Ce minigène code une protéine GFP inactive. Suite à sa co-transfection avec des PTM munis de différents domaines de liaison et capables de restaurer l'activité GFP sous réserve de réaction de *trans*-épissage, il est possible, par cytométrie de flux, d'isoler les domaines de liaisons conférant la meilleure efficacité au PTM (Mitchell and McGarrity, 2005).



**Figure 15 : La boucle de sécurité.**

La boucle de sécurité est une structure secondaire se créant sur la partie intronique du PTM. Une fois le PTM transcrit, son intron se replie partiellement sur lui-même. Il ne se dépliera que si son l'hybridation avec le transcrit devient plus stable. Cette stratégie permet de cibler le PTM précisément, en l'empêchant d'interagir avec d'autres transcrits cellulaires. *Adapté de (Mansfield et al., 2000)*

#### **2.2.3.3.2.6.3 Présence ou absence d'une queue polyadénylée ?**

La question de la présence d'une queue polyadénylée en 3' des PTM 5' a été étudiée. Si elle ne pose pas de problème mécanistique dans le cas des PTM 3', dans celui des PTM 5', la queue polyA étant située en aval du domaine de liaison, sa présence pourrait gêner l'hybridation du domaine de liaison sur sa cible. De plus, dans le cas des trois types de PTM, la présence de la queue polyA pourrait entraîner le transport des PTM non épissés vers le cytoplasme, diminuant l'efficacité de réaction.

Concernant les PTM 5', il semble que la présence d'une queue polyA ne réduit pas l'efficacité de réaction, au contraire elle l'augmente sensiblement, au moins dans le modèle LacZ ayant servi à l'étude (Mansfield et al., 2003). Concernant les PTM 3', une autre étude a voulu savoir si l'ajout du snRNA U7 en 3' du PTM augmentait l'efficacité de réaction en bloquant le PTM dans le noyau. Bien que les résultats ne soient pas représentés dans la publication, il semblerait que l'efficacité de réaction ne soit pas augmentée (Coady et al., 2007). Par conséquent, placer les PTM 5' et 3' en amont d'une queue polyA ne semble pas bloquer la réaction de *trans*-épissage, au moins dans les modèles étudiés.

Dans l'étude qui fait l'objet de ce manuscrit, nous avons souhaité étudier le potentiel du *trans*-épissage comme outil de thérapie génique dans le modèle canin de la mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII ou maladie de Sly), membre de la famille des maladies de surcharge lysosomale. Nous allons donc maintenant nous intéresser aux maladies de surcharge lysosomale en général, et à la MPS VII en particulier.

---

### ***3 Les maladies de surcharge lysosomale***

---

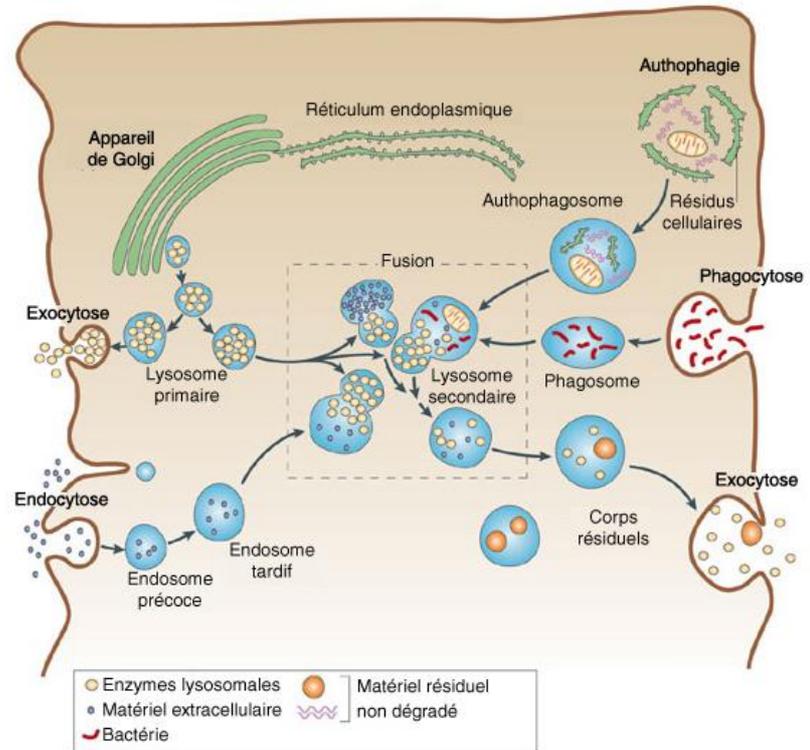
C'est en 1955 que Christian de Duve et ses collaborateurs décrivent les lysosomes. Ces particules cytoplasmiques, pourvues d'une membrane et contenant un grand nombre d'hydrolases sont capables de pouvoir lytique. Le lysosome est membre d'une série d'organelles connue sous le nom de système endosomal-lysosomal (ou appareil vacuolaire) (**Figure 16**). Les principaux composants de ce système sont l'endosome précoce, situé à la périphérie de la cellule, l'endosome tardif, périnucléaire, et le lysosome. Ils forment une chaîne responsable du catabolisme d'un grand nombre de protéines intracellulaires, de protéines extracellulaires ou membranaires internalisées dans la cellule par endocytose ou autophagie, voir même de bactéries internalisées par phagocytose. Dans les cas d'internalisation d'éléments extracellulaires ou pathogènes dans la cellule, l'endosome (ou le phagosome) contenant le substrat fusionne avec un lysosome primaire contenant les hydrolases acides, produisant un lysosome secondaire, siège de la dégradation des substrats. Le lysosome est donc le compartiment final du système endosomal-lysosomal. Cela dit, il est capable de fusionner avec la membrane plasmique pour délivrer son contenu à l'extérieur de la cellule par exocytose (Luzio et al., 2000). Il est composé d'une membrane, de vésicules contenant des hydrolases, et est caractérisé par un pH acide. La membrane contient des transporteurs ayant pour rôle l'export de matériel dégradé vers le cytosol, ainsi qu'une pompe à proton permettant la baisse du pH à l'intérieur du lysosome (Arai et al., 1993).

C'est dans le lysosome que les substrats sont catalysés lors d'une réaction en chaîne impliquant plusieurs hydrolases agissant séquentiellement. L'action d'une hydrolase est nécessaire pour permettre à la suivante d'agir à son tour. Le lysosome contient plus de 50 enzymes catalytiques, parmi lesquelles des protéases, des nucléases, des lipases, des glycosylases, des phosphatases, des phospholipases et des sulfatases. Toutes sont des hydrolases acides nécessitant une baisse du pH entre 4 et 5 pour trouver leur activité enzymatique optimale. La perte de fonction d'une des hydrolases présentes dans les lysosomes suffit à provoquer une cascade d'anomalies métaboliques, l'accumulation des

substrats sujets à la catalyse aboutissant à une distorsion du lysosome, finissant par provoquer des dysfonctionnements cellulaires, tissulaires, et finalement des maladies.

**Figure 16 :** Le système endosomal-lysosomal.

L'appareil endosomal-lysosomal est responsable de la digestion intracellulaire de macromolécules extra- ou intracellulaires. Des vésicules de clathrine permettent l'internalisation de macromolécules extracellulaires par endocytose pour former l'endosome primaire. L'endosome primaire part de la membrane plasmique pour aller vers le noyau cellulaire. Durant ce trajet, il s'acidifie et devient un endosome tardif. L'endosome tardif fusionne alors avec un lysosome primaire (contenant les hydrolases acides) pour former un lysosome secondaire. La distinction entre endosome et lysosome est basée sur le pH. Le pH lysosomal est le plus acide. C'est dans le lysosome que le



plus de dégradations ont lieu. Basée sur le même principe, la dégradation des éléments intracellulaires ou des éléments extracellulaires internalisés par phagocytose démarre par la formation d'un endosome (autophagosome ou phagosome) qui fusionne avec un lysosome, siège du processus catalytique. Les lysosomes secondaires peuvent soit rester dans la cellule et devenir un corps résiduel, soit être transportés vers la surface cellulaire, fusionner avec membrane plasmique et exporter leur contenu en dehors de la cellule. *Adapté de (Desnick and Schuchman, 2002)*

### 3.1 La super famille des maladies de surcharge lysosomale

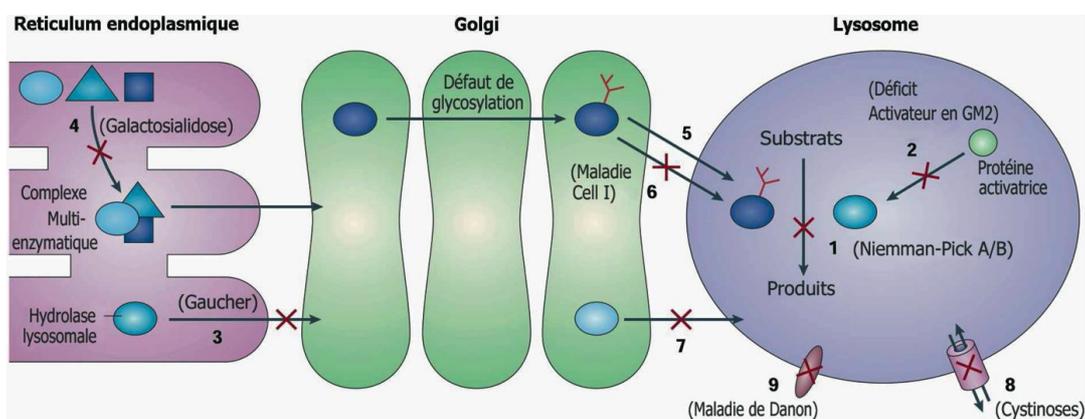
Les maladies de surcharge lysosomale (LSD pour *Lysosomal Storage Disease*) sont définies comme un groupe de maladies génétiques orphelines du catabolisme cellulaire. Une quarantaine de pathologies différentes sont aujourd'hui connues.

Elles sont classées par familles de maladies en fonction du substrat accumulé. Ainsi, on distingue les mucopolysaccharidoses (accumulation de mucopolysaccharides), les glycoséoses (accumulation de glycogène), les lipidoses (accumulation de sphingolipides) et

les glycoprotéinoses (accumulation de glycoprotéines). Chaque famille est subdivisée en fonction de l'enzyme déficiente.

Sur le plan de la prévalence, ces maladies, prises individuellement, sont rares. Regroupées, elles ont une fréquence d'apparition de 1/7000 à 1/8000 naissances (Meikle et al., 1999; Poorthuis et al., 1999). Les mucopolysaccharidoses (ou MPS), quant à elles, ont une fréquence d'apparition de 1/22 000 naissances environs, et représentent 35% des cas de LSD (Meikle et al., 1999).

Ces maladies sont monogéniques et sont le plus souvent causées par la perte de fonction d'une hydrolase acide. Cependant, des LSD ont été identifiées, causées par la perte de fonction d'un facteur impliqué dans l'adressage, la maturation ou encore la stabilité des hydrolases (Futerman and van Meer, 2004). Les principales causes des LSD sont résumées sur la **Figure 17**. Dans certains cas, plusieurs protéines sont impliquées dans l'apparition de la maladie.



**Figure 17 :** Les principales causes des maladies de surcharge lysosomale.

La plupart des mutations dans les maladies de surcharge lysosomale aboutissent au déficit d'une enzyme lysosomale conduisant à une accumulation des substrats non dégradés dans le lysosome (1). Dans d'autres cas, c'est une protéine permettant une activité optimale de l'hydrolase qui est défectueuse ou absente (2). Une maladie de surcharge lysosomale peut également être due à une mutation conduisant à une erreur d'adressage à la sortie du reticulum endoplasmique (RE) (3). Le transport défectueux de l'enzyme lysosomale en dehors du RE peut également être causé par l'absence d'un complexe multi-enzymatique nécessaire à ce transport (4). Dans l'appareil de Golgi, un défaut de glycosylation peut aboutir à une enzyme avec une activité catalytique réduite (5). Un défaut de glycosylation peut également entraîner la production d'enzyme ne pouvant lier les Rc au Mannose-6-P empêchant ainsi leur entrée dans les lysosomes (6). D'autres étapes de transport à partir de l'appareil de Golgi peuvent être impliquées (7). Il peut également s'agir d'un déficit ou d'un dysfonctionnement d'un des transporteurs localisés dans la membrane lysosomale (8) ou de protéines régulatrices (9). Les hydrolases lysosomales sont représentées par différentes teintes de bleu. Un exemple de maladies de surcharge lysosomale est donné entre parenthèses. *Adapté de (Futerman and van Meer, 2004).*

La plupart des LSD ont un mode de transmission autosomique récessif, à l'exception de la MPSII (ou maladie de Hunter, déficit en iduronate sulfatase), la maladie de Fabry (déficit en  $\alpha$ -galactosidase) et celle de Danon (déficit de LAMP-2), impliquant le chromosome X (Futerman and van Meer, 2004). Des mutations faux-sens, non-sens, des délétions, des insertions et des altérations de l'épissage peuvent avoir lieu tout le long du gène impliqué, engendrant une perte de fonction totale ou partielle de la protéine, et provoquant au sein même d'une maladie des conséquences phénotypiquement différentes (Muenzer, 2004). Malgré tout, d'une façon générale, le tableau clinique de ces maladies englobe malformations squelettiques, dysmorphismes, organomégalie, problèmes cardiovasculaires, oculaires, cérébraux voir sensoriels.

### **3.2 Glycosaminoglycanes et mucopolysaccharidoses**

Les glycosaminoglycanes (GAG) ou mucopolysaccharides sont les composants polysaccharidiques des protéoglycanes. Ils sont composés de 20 à 200 de répétitions linéaires de disaccharides contenant un dérivé aminé glucosamine (N-acetyl-glucosamine, Glc-Nac) ou galactosamine (le N-acetyl-galactosamine, Gal-Nac). Le second glucide est un acide uronique. Au moins un des sucres des disaccharides est carboxylé ou sulfaté (Hopwood and Morris, 1990). Leur structure est résumée dans le **tableau 7**. Il en existe 4 types prépondérants : le dermatane sulfate (DS ; derme, tendon, ligament, cartilage fibreux), l'héparane sulfate (HS ; exprimé de façon ubiquitaire), le chondroïtine sulfate (CS ; cartilage élastique, cartilage hyalin, os, derme, cornée) et le kératane sulfate (KS ; cartilage, cornée). Leur dégradation a lieu dans le lysosome et fait intervenir une série d'enzymes, de nombre variable en fonction du polysaccharide à catalyser, agissant de façon séquentielle.

QuickTime™ et un  
décodeur de PDF (non compris)  
sont requis pour visionner cette image.

**Tableau 7: Composition des principaux GAG.**

Les sites de sulfatation sont indiqués en bleu. *D'après (Hopwood and Morris, 1990).*

La conséquence la plus marquante de la perte de fonction d'une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation des GAG est l'accumulation intralysosomale des GAG non dégradés ou partiellement dégradés. Ceci entraîne une cascade d'évènements métaboliques anormaux. Cette surcharge est progressive et entraîne une hypertrophie du système lysosomal. Dans le cas de la MPS VII, les DS, les CS et les HS sont accumulés. Comme représenté dans la **figure 18**, d'autres MPS conduisent à des accumulations de ces mêmes substrats, d'où des symptômes pathologiques parfois proches entre les différentes MPS. Plus précisément, l'HS est aussi accumulé dans la MPS I (Hurler/Scheie), dans la MPS II (Hunter) et dans les MPS III a, b et c (Sanfilippo de type a, b et c). Le DS quant à lui est accumulé, en plus de la MPS VII, dans la MPS I (Hurler/Scheie), dans la MPS II (Hunter) et dans la MPS VI (Maroteaux-

Lamy). Le CS lui n'est accumulé que dans la MPS VII (Sly) et dans la MPS IVa (Morquio de type a) (Hopwood and Morris, 1990).

QuickTime™ et un  
décodeur de PDF (non compris)  
sont requis pour visionner cette image.

***Figure 18 : GAG et MPS associées.***

**1** :  $\alpha$ -L-Iduronidase (MPS I, Hurler et Sheie). **2** : Iduronate-2-sulfatase (MPS II, Hunter). **3a** : Sulphamidase (MPS IIIa, Sanfilippo A). **3b** :  $\alpha$ -N-Acétyleglucosaminidase (MPS IIIb, Sanfilippo B). **3c** : Ac CoA N-Acétyletransferase (MPS IIIc, Sanfilippo C). **3d** : Glucosamine-6-sulfatase (MPS IIId, Sanfilippo D). **4a** : N-Acétylegalctosamine-6-sulfatase (MPS IVa, Morquio A). **6** : N-Ac-galactosamine 4-sulfatase (MPS VI, Maroteaux-Lamy). **7** :  $\beta$ -D-Glucuronidase (MPS VII, Sly). *D'après (Hopwood and Morris, 1990)*

### **3.3 La Mucopolysaccharidose de type VII**

#### **3.3.1 Pathologie**

##### **3.3.1.1 Généralités**

La Mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII), ou maladie de Sly, fut décrite en 1974 (Sly et al., 1974). C'est une maladie autosomique récessive causée par la perte de fonction de la  $\beta$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.31, GusB) dont l'incidence est extrêmement faible (1/2000000 environs (Meikle et al., 1999)). Chez l'homme, 45 mutations sur le gène de la  $\beta$ -glucuronidase ont été identifiées, dont 90% sont des mutations ponctuelles (Tomatsu et al., 2002). Une perte de fonction de la  $\beta$ -glucuronidase résulte en la dégradation incomplète et l'accumulation de GAG contenant un résidu glucuronate (HS, DS, CS).

##### **3.3.1.2 Symptômes**

Les symptômes de la MPS VII sont variés, mais englobent malformations osseuses et cartilagineuses, cardiaques, musculaires, viscérales, mentales et sensorielles. Dans les formes les plus sévères de la maladie, les individus sont porteurs de manifestations cliniques touchant aussi bien le système nerveux central (provoquant un retard mental, un défaut d'audition *etc.*) que les organes périphériques (hépatosplénomégalie, nanisme, dysformisme facial, opacité cornéenne *etc.*). De plus, chez les patients MPS, les GAG sont excrétés en excès dans les urines (Beck, 2007; Futerman and van Meer, 2004; Haskins and Giger, 1997).

Les individus affectés présentent une hétérogénéité phénotypique allant des formes les plus sévères (mort fœtale) aux plus légères (légers changements squelettiques et intelligence normale) (Fyfe et al., 1999). En effet, en fonction de l'emplacement et de la nature de la mutation, l'équivalent phénotypique sera plus ou moins marqué (Muenzer, 2004). En l'occurrence, la substitution d'une lysine par une phénylalanine en position 176 représente 20% des mutations ponctuelles, et provoque un phénotype médian en termes de gravité clinique. Une substitution d'un acide aminé plus impliqué dans l'activité enzymatique

provoque quant à elle un profil pathologique beaucoup plus sévère, associé à une perte complète d'activité enzymatique de la  $\beta$ -glucuronidase (Tomatsu et al., 2002).

### *3.3.1.3 Lien de cause à effet entre le défaut d'activité enzymatique et les symptômes cliniques*

#### *3.3.1.3.1 Cause architecturale*

Il est communément accepté que l'augmentation de taille des lysosomes chez les patients atteints de LSD et plus particulièrement de MPS est en grande partie responsable des signes cliniques associés. En l'occurrence, une augmentation du nombre et de la taille des lysosomes provoque une distorsion mécanique et un changement d'architecture de la cellule, encombrant les organelles avoisinantes ainsi que le noyau cellulaire. Pour amoindrir l'encombrement, la cellule finit par grossir, entraînant une organomégalie (Haskins and Giger, 1997).

Cependant, bien que la physiopathologie des lésions neurologiques soit peu connue, les choses semblent être différentes dans le système nerveux central. Bien sûr, les accumulations de GAG dans les neurones, les cellules gliales et dans les cellules périvasculaires provoquent ici aussi des distorsions cellulaires. Néanmoins, contrairement aux manifestations périphériques, la surcharge centrale en GAG ne provoque pas d'organomégalie. À l'inverse, dans le système nerveux central, elle provoque une neurodégénérescence. De plus, il est observé une accumulation secondaire des gangliosides GM2 et GM3 dans les neurones, un transport intracellulaire anormal, une astrogliose et une microgliose (réactions pro-inflammatoires en réponse aux lésions), et une altération de la barrière hémato-encéphalique. La surcharge en gangliosides dans les MPS serait la conséquence d'une inhibition de la neuraminidase et d'autres enzymes lysosomales secondaires à l'accumulation de GAG (Avila and Convit, 1975; Baumkotter and Cantz, 1983; Constantopoulos and Dekaban, 1978; Kint et al., 1973).

### 3.3.1.3.2 Augmentation secondaire de protéines lysosomales et non lysosomales

Cependant, il est difficile d'expliquer l'ensemble des symptômes périphériques visibles chez les sujets MPS VII par une distorsion mécanique de la cellule (Woloszynek et al., 2007). Au niveau périphérique, des augmentations secondaires ont pu être identifiées. Les changements métaboliques secondaires provoquent une variation du niveau d'expression d'enzymes lysosomales et non lysosomales.

Ainsi, l' $\alpha$ -galactosidase, la  $\beta$ -hexosaminidase, l' $\alpha$ -mannosidase, la phosphatase acide, l'aryl sulfatase A, l' $\alpha$ -fucosidase et la sphingomyélinase acide sont augmentées (Kyle et al., 1990; Woloszynek et al., 2004). Le niveau d'expression de ces enzymes est d'ailleurs fréquemment utilisé pour confirmer la remise en marche du lysosome dans les essais thérapeutiques (Bastedo et al., 1994; Birkenmeier et al., 1991; Daly et al., 1999; O'Connor et al., 1998; Sands et al., 1994; Sleeper et al., 2004; Tomatsu et al., 2002) etc.). À l'inverse, d'autres protéines lysosomales sont sous exprimées, comme le récepteur cation indépendant du M6P (Mannose-6-Phosphate) (Woloszynek et al., 2004).

De plus, le fort niveau d'expression de certaines protéines pro-inflammatoires (VCAM1 et MCP1), de même qu'une faible expression de Leptine sont visibles chez la souris, associés à un défaut de stockage adipocitaire (Woloszynek et al., 2007). Enfin, la transcription et/ou la stabilité de certains ARN messagers (ARNm) codant des enzymes non lysosomales est altérée. Il en est ainsi, dans le modèle murin de la MPS VII, pour des ARNm codant des protéines impliquées dans divers processus biologiques. La formation du cytosquelette est modifiée, avec une augmentation des messagers codant la Myosine I par exemple. De même pour l'adhésion cellulaire, suite à une augmentation des messagers codant les cathepsines A, B, S et Z. La croissance est elle aussi touchée (augmentation des messagers codants pour le récepteur à l'hormone de croissance, et pour les facteurs de croissance insuline IGFBP1/2). Le métabolisme et le transport des lipides et notamment du cholestérol voit son transcriptome modifié, de même que le cytochrome P450 et la metallothionéine 1 (Woloszynek et al., 2004).

Nous comprenons alors que l'ensemble des manifestations cliniques observées, bien que causées par une mutation sur un gène unique provoquant l'augmentation de taille du lysosome dans la cellule, est le fruit du dysfonctionnement d'un ensemble de processus biologiques.

#### 3.3.1.4 La $\beta$ -glucuronidase

##### 3.3.1.4.1 Généralités

Le gène de la  $\beta$ -glucuronidase est situé sur le chromosome 7 chez l'homme (gene ID : 2990), 5 chez la souris (gene ID 110006) et 6 chez le chien (gene ID 403831). La longueur des gènes humain, murin et canin, composés de 12 exons et 11 introns, est respectivement de 21,5kb, 13,8kb et 13,5kb. L'homologie de séquence des ADN complémentaires est de 75% de la souris à l'homme, de 74% du chien à l'homme, et de 71% de la souris au chien, indiquant une variabilité assez conséquente, retrouvée au niveau protéique.

Le gène de la  $\beta$ -glucuronidase code une protéine homotétramérique (Oshima et al., 1987) dont les monomères sont constitués de 651 acides aminés chez l'homme. La caractérisation de la  $\beta$ -glucuronidase humaine par cristallographie aux rayons X et les comparaisons de séquences de plusieurs espèces ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique de la protéine humaine (Islam et al., 1999; Jain et al., 1996; Wong et al., 1998). Ces études montrent que les résidus arginine en position 382 (R382), et les acides glutamiques en positions 451 et 540 (E451 et E540) forment le site catalytique de la protéine (Islam et al., 1999; Wong et al., 1998). Une conservation inter-espèce de ces trois acides aminés existe (Tomatsu et al., 2002).

##### 3.3.1.4.2 Transcription – Maturation

Suite à sa transcription, les événements de maturations de l'ARN pré-messager GusB ont lieu. Plus précisément, l'ajout d'une coiffe en 5', d'une queue polyadénylée en 3', et l'épissage du transcrit permettent à la molécule d'être exportée vers le cytoplasme et d'être

traduite. Aucun événement d'épissage alternatif du transcrit  $\beta$ -glucuronidase n'a, à ce jour, été mis en évidence.

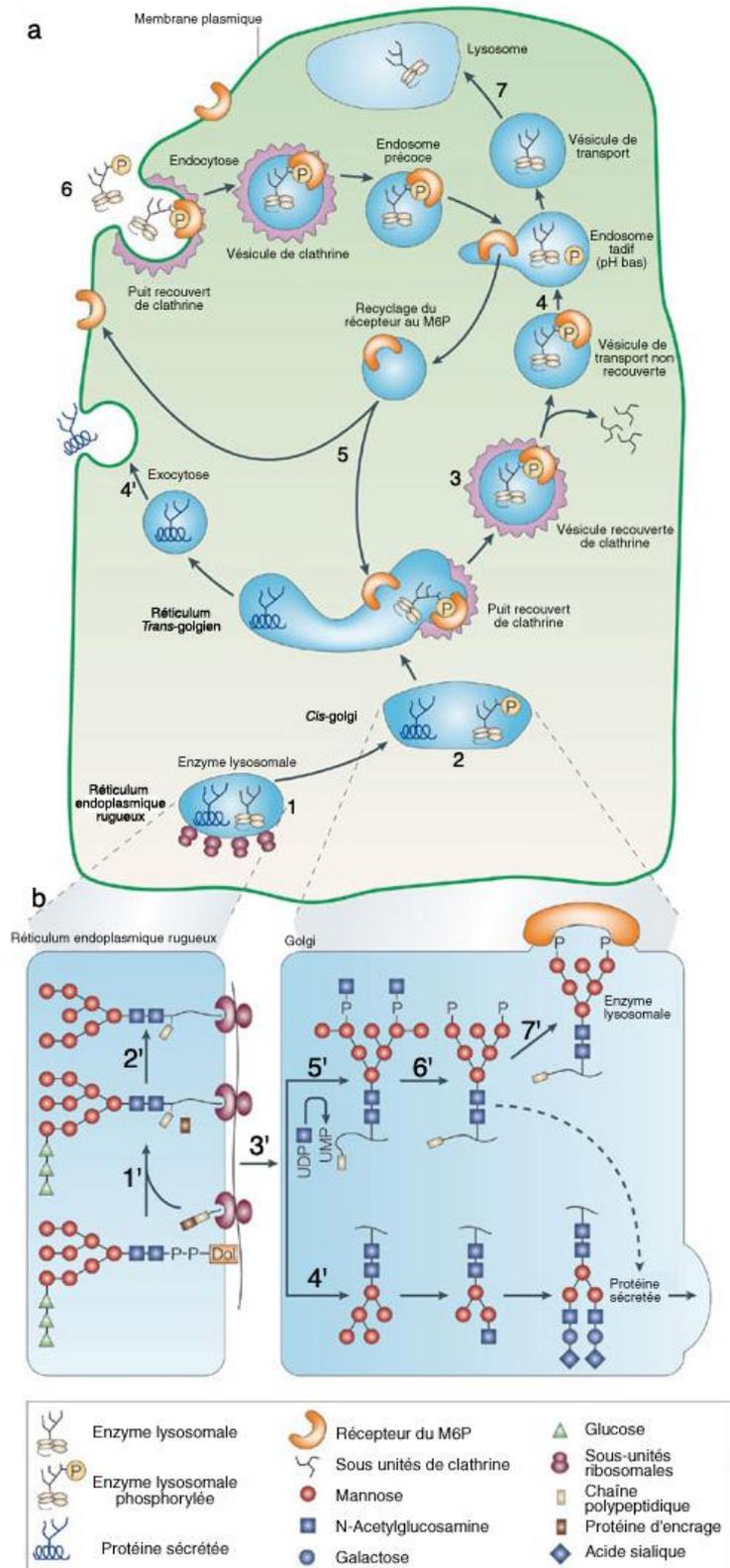
#### 3.3.1.4.3 *Traduction - Maturation – Adressage*

Comme toutes les hydrolases lysosomales, la  $\beta$ -glucuronidase est synthétisée sous forme de préproenzyme dans les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (RER), puis elle subit des événements de maturation. Brièvement, elle est tout d'abord transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique où sont ajoutés des oligosaccharides en position N-Term (**Figure 19b**). Les oligosaccharides sont ensuite partiellement digérés, et la glycoprotéine est transportée à l'appareil de Golgi. Plusieurs modifications post-traductionnelles vont y avoir lieu, aboutissant à l'ajout d'un marqueur mannose-6-phosphate. Ce résidu Man-6-P peut être reconnu par 2 types de récepteurs. Le premier est un petit récepteur cation dépendant (CD-MPR) et le second un grand récepteur cation indépendant (CI-MPR). Ils sont localisés dans le réseau *trans*-Golgien, dans les endosomes précoces et tardifs, et dans la membrane plasmique. Ils sont absents des lysosomes. Ils vont permettre le transport de l'enzyme de l'appareil de Golgi au compartiment endosomal *via* des vésicules de clathrine (Desnick and Schuchman, 2002) (**Figure 19a**). Dans l'endosome tardif, le pH acide entraîne la dissociation des récepteurs et de l'enzyme. L'enzyme est alors adressée au lysosome. Une faible fraction des hydrolases acides (5 à 20%) est sécrétée avant de parvenir aux lysosomes. L'enzyme sécrétée peut être internalisée et transférée aux lysosomes des cellules avoisinantes grâce aux récepteurs cation-indépendants présents dans la membrane plasmique de nombreuses cellules, telles que les fibroblastes (Distler et al., 1979; Kaplan et al., 1977; Natowicz et al., 1979). Ce mécanisme de sécrétion-recapture est à la base des thérapies mises en place pour le traitement des maladies lysosomales, depuis qu'une correction des lésions de surcharge a été observée sur des cultures de fibroblastes de patients Hurler (MPS I) et Hunter (MPS II), en co-cultivant les cellules de ces deux génotypes soit ensemble, soit avec des cellules normales (Fratantoni et al., 1968).

**Figure 19 : Maturation et adressage des hydrolases lysosomales.**

(a) : 1: Les ARN messagers sont traduits dans le réticulum endoplasmique. 2: dans l'appareil de Golgi : glycosylation et synthèse du marqueur de reconnaissance au mannose-6-phosphate. 3: transfert vers le lysosome par l'intermédiaire de récepteurs au mannose-6-phosphate en passant par des compartiments intermédiaires (vésicules de clathrine et endosomes). 4: les enzymes sont libérées de leur récepteur en milieu acide. 5: les récepteurs sont recyclés vers l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique. 6: environ 10% des enzymes lysosomales sont normalement sécrétées dans le milieu extracellulaire et peuvent être internalisées par endocytose par les cellules avoisinantes grâce à la présence sur ces cellules de récepteurs au mannose-6-phosphate. 7: transport des enzymes aux lysosomes.

(b) : dans le RER, 1': glycosylation des enzymes lysosomales par transfert en bloc d'un oligosaccharide préformé lié au dolichol. 2': perte de 3 résidus glucose et d'un résidu mannose. 3': transport des enzymes dans l'appareil de Golgi. 4': séparation des enzymes lysosomales des protéines de sécrétion et des protéines intégrantes de la membrane plasmique. 5' et 6': acquisition du signal de reconnaissance mannose-6-phosphate par l'action séquentielle de la phosphotransférase et la phosphodiesterase. 7' : les enzymes phosphorylées se lient aux récepteurs aux mannose-6-phosphate associés aux vésicules recouvertes de clathrine qui bourgeonnent à partir de la membrane de l'appareil de Golgi. *Adapté des (Desnick and Schuchman, 2002).*



### 3.3.2 Les Modèles animaux de la MPS VII

Comme nous l'avons vu, les patients atteints de MPS en général et de MPS VII en particulier présentent des variabilités phénotypiques importantes. La validation d'une approche thérapeutique est rendue difficile par ces variations individuelles, ce qui, en plus de raisons médicales et/ou sanitaires, a donné une importance cruciale aux modèles animaux de la MPS VII. Dans les études pré-cliniques effectuées chez l'animal, il est aussi important pour l'expérimentateur de définir le degré d'innocuité lié à la manipulation que son niveau curatif, dans un environnement génique et phénotypique plus stable que celui de l'homme.

Trois modèles animaux de la MPS VII ont été décrits. Des modèles canins, murins et félins, tous trois naturels ont été isolés et caractérisés (Birkenmeier et al., 1989; Fyfe et al., 1999; Gitzelmann et al., 1994; Haskins et al., 1984). Ces modèles animaux portent une mutation sur le gène de la  $\beta$ -glucuronidase. Les surcharges de GAG sont identiques à celles décrites auparavant chez l'Homme (accumulation de DS, CS et HS), de même que les lésions histopathologiques. Enfin, le phénotype décrit chez ces animaux est similaire à celui des enfants atteints de MPS VII.

#### 3.3.2.1 Le modèle canin

Isolé 10 ans après la description humaine de la maladie (Haskins et al., 1984), le modèle canin de la MPS VII présente les caractéristiques humaines de la maladie. On retrouve des anomalies cardiaques, squelettiques, viscérales, oculaires et sensorielles, associées à un défaut locomoteur et une croissance plus difficile. La maladie est évolutive, et les chiens atteints meurent généralement durant la première année de vie. Les chiots naissants paraissent physiquement presque normaux, mais les symptômes apparaissent dans les premiers jours de la vie, indiquant une forte sévérité de la mutation.

La cartographie du gène a été effectuée, et la mutation a été décrite. Il s'agit d'une substitution d'une guanosine par une adénosine au début de l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase, provoquant une substitution d'une arginine par une histidine en position 166 de la protéine

(R66H) (Ray et al., 1998). La protéine mutée a été caractérisée comme instable, mais les animaux malades sont toujours porteurs d'une activité enzymatique résiduelle, chiffrée entre 2% et 5% de l'activité enzymatique normale (Ray et al., 1999). La cartographie de la protéine humaine situe les sites actifs de la protéine en position R382, E451 et E540 (Islam et al., 1999; Jain et al., 1996; Wong et al., 1998). Une comparaison de séquence entre la protéine humaine et canine montre que ces acides aminés sont conservés dans la  $\beta$ -glucuronidase canine. Finalement, ces études montrent que, chez le chien MPS VII, la perte d'activité enzymatique n'est pas due à défaut de fonction des sites catalytiques, mais à un défaut de stabilité de l'homotétramère  $\beta$ -glucuronidase.

### 3.3.2.2 Le modèle murin

Décrit par Edouard Birkenmeier et ses collaborateurs (Birkenmeier et al., 1989), le modèle murin de la MPS VII est un modèle naturel de la maladie. La mutation a été décrite dans une lignée de souris dérivée de la lignée C57BL/6. Bien que les souris homozygotes récessives paraissent normales à la naissance, les premiers signes physiques de la maladie apparaissent 21 jours après la naissance. Ces souris sont atteintes d'un retard de croissance, de dysmorphie faciale et squelettiques, d'hypertrophie hépatique et splénique, d'opacité cornéenne. Les mâles sont décrits comme stériles, alors que les femelles sont aptes à se reproduire, mais présentent des défauts de lactation. L'étude histologique montre des inclusions lysosomales très prononcées (Birkenmeier et al., 1989; Vogler et al., 1990). De plus, l'analyse des substrats non dégradés chez le souriceau nouveau-né, de même que chez le fœtus, montre des accumulations lysosomales très précoces (Vogler et al., 2005a). Enfin, ces souris présentent une durée de vie largement diminuée.

La mutation responsable du phénotype a été décrite. Il s'agit d'une délétion d'une cytosine au début de l'exon 10 de la  $\beta$ -glucuronidase (Sands and Birkenmeier, 1993). Cette délétion résulte en un décalage du cadre ouvert de lecture, et en l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 10. Il en résulte une prise en charge du message  $\beta$ -glucuronidase par la voie « NMD » (*Nonsense Mediated Decay*) responsable de la destruction des messages

anormaux, et une baisse de plus de 200 fois de la quantité des ARN messagers  $\beta$ -glucuronidase chez ces souris par rapport aux souris saines (Birkenmeier et al., 1989). L'activité enzymatique correspondante a été mesurée comme nulle (Birkenmeier et al., 1989).

### 3.3.2.3 Le modèle félin

Dernier modèle décrit, le modèle félin de la MPS VII a d'abord été identifié dans un cas unique (Gitzelmann et al., 1994), puis dans une famille de chats domestiques (Fyfe et al., 1999). C'est dans le 2<sup>ème</sup> cas qu'une lignée de chats MPS VII a été créée. Chez ces chats, l'apparition des symptômes a lieu 2 mois après la naissance. Des anomalies squelettiques, respiratoires, cornéennes et développementales importantes ont été relevées. Ces chats sont atteints de mort prématurée, probablement causée par défaut respiratoire associé aux malformations squelettiques, à l'âge d'un an et demi. Les examens histopathologiques révèlent une architecture cartilagineuse anormale, et des vacuolisations importantes dans tous les tissus examinés (Fyfe et al., 1999).

Une perte d'activité  $\beta$ -glucuronidase est retrouvée. Elle est liée à une substitution d'une guanosine par une adénine, engendrant une substitution d'un glutamate vers une lysine en position 351 de la protéine (E351K). La structure tertiaire du monomère est alors corrompue, le tétramère est déstabilisé (Fyfe et al., 1999).

Cependant, dans ce modèle, et contrairement aux cas des maladies humaine, murine et canine, l'analyse des GAG dans les urines montre une augmentation des CS urinaires, mais pas des DS, ni des HS. De plus, les augmentations secondaires d' $\alpha$ -Mannosidase, d' $\alpha$ -L-Iduronidase, d'Arylsulfatase A et B ne sont pas retrouvées (Fyfe et al., 1999). Ce modèle est donc un modèle imparfait de la maladie, puisque les manifestations biochimiques primaires et secondaires de la maladie ne sont pas identiques à celles de la maladie humaine. Ce modèle, contrairement aux modèles canins et murins, est resté peu utilisé pour la validation pré-clinique d'approches thérapeutiques.

### 3.3.3 Approches thérapeutiques

Les traitements aujourd'hui en vigueur dans un certain nombre de MPS sont uniquement destinés à corriger de façon symptomatique et palliative les manifestations cliniques de la maladie. En effet, des suivis cliniques orthopédiques, cardiaques, ophtalmologiques sont par exemple des moyens de réduire les malformations osseuses, cardiaques et visuelles des patients atteints de certaines formes de MPS (Wraith, 1995).

La nécessité de traitement de ces maladies est donc bien réelle. De plus, les modèles animaux de la MPS VII ont souvent été utilisés comme outils de validation d'approches curatives des maladies de surcharge lysosomale en général. La grande contrainte à laquelle ont été confrontées les équipes travaillant sur la MPS VII est la nécessité de corriger aussi bien les lésions périphériques que centrales et la difficulté de passer la barrière hémato-méningée. Trois grandes approches ont notamment été étudiées.

La première est l'approche cellulaire, par greffe de moelle osseuse (Bastedo et al., 1994; Sammarco et al., 2000; Sands et al., 1995), de précurseurs hématopoïétiques génétiquement modifiés (Marechal et al., 1993; Wolfe et al., 1992), par implantation de néo-organes génétiquement modifiés (Moullier et al., 1995; Moullier et al., 1993a; Moullier et al., 1993b) ou par implantation de cellules encapsulées (Nakama et al., 2006; Ross et al., 2000). Une tentative de greffe de moelle osseuse chez l'Homme a même été effectuée chez une fillette de 12 ans atteinte d'une forme modérée de la maladie, avec des résultats encourageants (Yamada et al., 1998).

La deuxième approche est l'enzymothérapie substitutive (Brady, 2006). Différents âges d'administration (Grubb et al., 2008b; Vogler et al., 1993; Vogler et al., 1996), différentes posologies (Vogler et al., 2005b), modifications chimiques (Grubb et al., 2008a; Montano et al., 2008; Sands et al., 2001) et molécules adjuvantes (Urayama et al., 2007) ont été testées, avec pour but de traiter les lésions centrales et périphériques. D'une façon générale, les lésions périphériques peuvent être traitées par injection répétée de l'enzyme.

Cependant, même si quelques études montrent la possibilité de passer la barrière hémato-méningée (Grubb et al., 2008a; Grubb et al., 2008b; Urayama et al., 2007), la correction des lésions centrales est encore aujourd'hui un des enjeux principaux de l'enzymothérapie substitutive.

Enfin, la troisième approche est le transfert de gène (approche *in vivo*) (Sands and Davidson, 2006). Des stratégies utilisant les vecteurs retroviraux (Ponder et al., 2002; Xu et al., 2002), lentiviraux (Stein et al., 2001), adénoviraux (Kosuga et al., 2000; Ohashi et al., 1997), AAV (Daly et al., 2001; Daly et al., 1999; Frisella et al., 2001) et herpétiques (Berges et al., 2006) ont été testées, de même que différents sites d'injection, centraux et périphériques. Ici aussi, les lésions périphériques peuvent être corrigées (Ponder et al., 2002), mais le passage de l'enzyme ou du vecteur dans le système nerveux central n'est toujours pas achevé. Certaines équipes travaillent sur des possibilités d'injection intracérébrales de vecteurs (Ciron et al., 2006). La logique d'étude serait d'ajouter au traitement périphérique (enzymothérapie ou transfert de gène) un traitement central, permettant la diminution des symptômes centraux et périphériques.

Toutes ces études tiennent compte et utilisent la voie de sécrétion-recapture mise en évidence durant les années 1970 (Distler et al., 1979; Kaplan et al., 1977; Natowicz et al., 1979). En effet, l'existence de ce phénomène facilite la voie aux approches thérapeutiques, puisque l'enzyme, qu'elle soit sécrétée par des cellules issues de manipulations génétiques, issues d'une greffe de moelle osseuse ou qu'elle soit directement administrée par voie intraveineuse, pourra voyager au sein du système sanguin et être captée par des cellules distantes. Il n'est donc pas nécessaire de corriger l'ensemble des cellules déficientes.

## ***4 Le trans-épissage dans le modèle canin de la MPS VII***

---

Dans notre étude, nous avons évalué la faisabilité du *trans*-épissage dans le modèle canin de la MPS VII. Ici, nous ne nous plaçons pas dans une optique thérapeutique, la principale raison tenant au fait que chez l'Homme, la séquence du gène et les mutations sont différentes (74% d'homologie du chien en l'Homme en considérant les séquences codantes uniquement), et que les mutations humaines ne pourraient en aucun cas être réparées à l'aide d'un PTM corrigeant l'ARN canin. La MPS VII est un modèle d'étude du *trans*-épissage. Le choix du modèle tient au fait que la MPS VII est souvent prise comme modèle d'étude des stratégies de corrections des maladies de surcharge lysosomales d'une part, et au fait que le modèle canin de la maladie est dû à une mutation ne provoquant pas la perte totale d'activité d'autre part. Dans ce modèle, la mutation provoquant un défaut de stabilité de l'homotétramère, il est possible que la tétramérisation d'une ou plusieurs sous-unité(s) réparée(s) avec une ou plusieurs sous-unité(s) mutée(s) augmente la stabilité du complexe, augmentant l'activité enzymatique résultante. De plus, les études *in vivo* réalisées au préalable dans le domaine du *trans*-épissage ne s'intéressant qu'à des modèles de rongeurs, nous avons souhaité nous intéresser à un modèle de gros animal, le modèle canin de la maladie.

Dans une logique d'étude globale du *trans*-épissage, nous avons testé la possibilité de reprogrammation à l'aide de PTM 5', 3' et doubles. De plus, pour travailler plus facilement sur la réactivité des PTM, nous avons commencé par créer un « minigène GusB », composé du cDNA de la  $\beta$ -glucuronidase canine à l'intérieur duquel l'exon 3 muté a été placé, entouré de ses introns (*cf.* **Figure 1 article**).

### **4.1 Construction des PTM**

Les PTM ont été créés, associés à divers domaines de liaisons s'hybridant tout le long des introns bordant l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase. Les PTM 5' ont été associés à 11 domaines de liaison de 25 pb à 130 pb de longueur, les PTM 3' à 17 domaines de liaison de 25 à 200 pb de

longueur, et les dPTM à 2 domaines de liaison en 5' et 2 domaines de liaison en 3', de 100 pb à 200 pb de longueur (cf. **figure 1 article**).

Les parties 5' et 3' des séquences exoniques de chaque PTM ont été dégénérées, c'est-à-dire que nous avons changé une paire de base sur trois dans les 30 premières et dernières paires de base des séquences codantes, sans modifier la séquence peptidique qui en est issue. Cette dégénérescence nous a permis de discriminer plus facilement les ARN *cis*- et *trans*-épissés par RT-PCR, ne se différenciant que par une substitution sans les dégénérescences (G/A en position 101 du troisième exon de la  $\beta$ -glucuronidase).

Enfin, pour faciliter la mise en évidence des protéines issues de la réaction de *trans*-épissage, nous avons ajouté un tag 3xflag en 5' des PTM 5' et en 3' des PTM 3'.

#### **4.2 Utilisation du snRNA U7**

De plus, nous avons voulu tester l'effet de la présence du snRNA U7 en aval des PTM 5', 3' et doubles. Comme nous l'avons vu, le snRNA U7 est un ARN impliqué dans la prise en charge des ARN codant les histones. Une version génétiquement modifiée existe et a permis à plusieurs équipes travaillant sur des stratégies de réorientation de l'épissage de concentrer les ARN antisens dans le noyau, particulièrement dans les sites d'épissages (Cf. chapitre 2.2.2.4). En ce qui nous concerne, son utilisation permettrait de la même manière de concentrer les PTM dans le noyau, afin d'éviter leur export dans le cytoplasme avant qu'ils n'aient réagi.

#### **4.3 Utilisation des ARN bifonctionnels**

Finalement, nous avons voulu tester l'effet des ARN bifonctionnels sur l'efficacité de *trans*-épissage. Cf. **chapitre 2.2.3.2.2**, les ARN bifonctionnels ont été montrés capables de rediriger le spliceosome vers l'inclusion de l'exon 7 de *smn2*. Ils agissent en permettant une

meilleure reconnaissance et une meilleure prise en charge de l'exon par le spliceosome. La notion de définition d'exon étant importante pour la prise en charge correcte des exons lors des réactions de *cis*-épissage, elle l'est dans le cas du PTM. Ce dernier étant composé d'une portion de cDNA, il est fort probable que des sites recruteurs de facteurs d'épissage soient manquant sur le PTM par rapport à l'ARN à corriger, ne serait-ce que le site 5'ss suivant dans le cas des PTM 3'. Dans notre cas, une meilleure reconnaissance du PTM agirait en faveur de l'inclusion du PTM, au détriment de l'inclusion de l'exon à corriger. Apporter dans l'environnement immédiat du PTM des activateurs de l'épissage pourrait donc agir en faveur de *trans*-épissage.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article qui suit, soumis à *Molecular Therapy* en Janvier 2009.

***RÉSULTATS***

# In vitro evaluation of *trans*-splicing in the canine mucopolysaccharidosis type VII model (submitted)

Sylvain P. Sachot<sup>1</sup>, Fabienne Rolling<sup>1</sup>, Philippe Moullier<sup>1,2</sup>, Caroline Le Guiner<sup>1</sup>

(1) INSERM UMR 649, CHU Nantes, Université de Nantes, Nantes, France and (2) Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Among corrective strategies in gene therapy, *trans*-splicing allows the reprogramming at the pre-messenger RNA (pre-mRNA) level of a mutant sequence by an exogenous and normal sequence carried by a Pre *Trans*-splicing Molecule (PTM) in a reaction controlled by the spliceosome. In this study, we evaluated the feasibility of *trans*-splicing in the canine model of mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII). We designed different PTM and adjuvant molecules including the U7 snRNA and some bifunctional RNA. Our results showed that in an artificial minigene context, *trans*-splicing allowed the reprogramming of the beta-glucuronidase (GUSB) transcript at the molecular and protein levels. However, this reaction was inconsistent in the natural context, i.e. the endogenous pre-mRNA where PTM were able to react with their target but at low efficiency. In this environment, no corrected protein was found even if a *trans*-spliced transcript could be detected, particularly in the presence of either a modified U7snRNA or a bifunctional RNA. This study underscores the difficulty of promoting therapeutic *trans*-splicing events within an endogenous natural situation even if efficient *trans*-splicing occurs on an exogenous minigene target.

## INTRODUCTION

Gene repair strategies that preserve the natural regulation of genes may have several advantages over substitutive gene therapy approaches for the treatment of genetic disorders [1]. Among them, *trans*-splicing allows the reprogramming of mutant pre-messenger RNA (pre-mRNA) during the splicing reaction in a tripartite reaction between the targeted transcript, the therapeutic Pre *Trans*-splicing Molecule (PTM), and the spliceosome machinery (reviewed in [2-4]). A PTM contains: i) a coding domain that includes the new or modified genetic information; ii) an adjacent intron with a functional splicing site; iii) a binding domain (BD) responsible for specific targeting of the pre-mRNA to be corrected. To date, PTM were designed to carry out two forms of *trans*-splicing: a PTM with a 5' splice site (ss) domain (5'PTM) that can *trans*-splice with a 3'ss in the target pre-mRNA, and a PTM with a 3'ss domain (3'PTM) that can *trans*-splice with a 5'ss in the target pre-mRNA. Coding information carried by 5'PTM encodes for the corrected exon and all the upstream exons [5], whereas 3'PTM coding sequence

encodes for the corrected exon followed by all downstream exons [6].

*Trans*-splicing can be achieved *in vitro* [5-13, 14, 15, 16] and *in vivo* in mice [17, 18, 19, 20, 21] for various transcripts including the  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotrophin 6 [6], cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [5, 7, 8, 10, 11], RET [9], factor VIII [17], CD40 Ligand [19], Tau [12], survival motor neuron-2 [13, 16], DNA protein kinase catalytic subunit [14], dystrophin myotonic protein kinase [15], and albumin [21], using 5'PTM [5] or 3'PTM [6-13, 14, 15, 16]. *Trans*-splicing has also been shown to be able to deliver toxins for cancer gene therapy [22], and to define gene expression by introducing a reporter gene in the coding sequence of the PTM [18, 20].

The mucopolysaccharidoses (MPS) are a family of lysosomal storage diseases (LSD) caused by the accumulation of partially degraded glycoaminoglycans (GAG) in the lysosomes. MPS VII is caused by the deficiency of acid hydrolase  $\beta$ -D-glucuronidase (GUSB). GUSB is a homotetrameric glycoprotein acid hydrolase localized predominantly in lysosomes of virtually all mammalian cells [23]. In dogs, MPS VII is caused by a single guanosine to adenine substitution in the third exon of the GUSB gene [24, 25]. This substitution leads to an arginine to histidine substitution at position 166 (R166H) in the resulting protein [25]. The mutated protein has been characterized as unstable [26], but contrary to the MPS VII mice [27], MPS VII dogs express a residual GUSB enzymatic activity, measured as 2-5% of normal dog GUSB activity using artificial substrate [26]. The active catalytic site has been identified in position R382, E451, and E540 of GUSB protein and is conserved among the different species [28-30]. The low level of enzymatic activity in the canine MPS VII canine model is due to instability and not to catalytic site disruption [26].

To evaluate the feasibility of *trans*-splicing technology in the canine MPS VII model, we tested the functionality of 5'PTM, 3'PTM and double PTM (dPTM). A dPTM contains both an intron with a 3'ss and an intron with a 5'ss and could in theory permit the precise replacement of an internal exon. In this study, the ability of 3'PTM, 5'PTM and dPTM to repair the mutated canine GUSB pre-mRNA was studied. Several 5'PTM, 3'PTM and dPTM were designed along with various BD for the *in vitro* reprogramming of the canine mutated GUSB pre-mRNA. We also tested the adjuvant effect of U7snRNA [31-34] and of

canine model

bifunctional RNA [33-37] to increase the efficiency of the *trans*-splicing reaction.

## RESULTS

### Design of a model system for canine GUSB pre-mRNA reprogramming

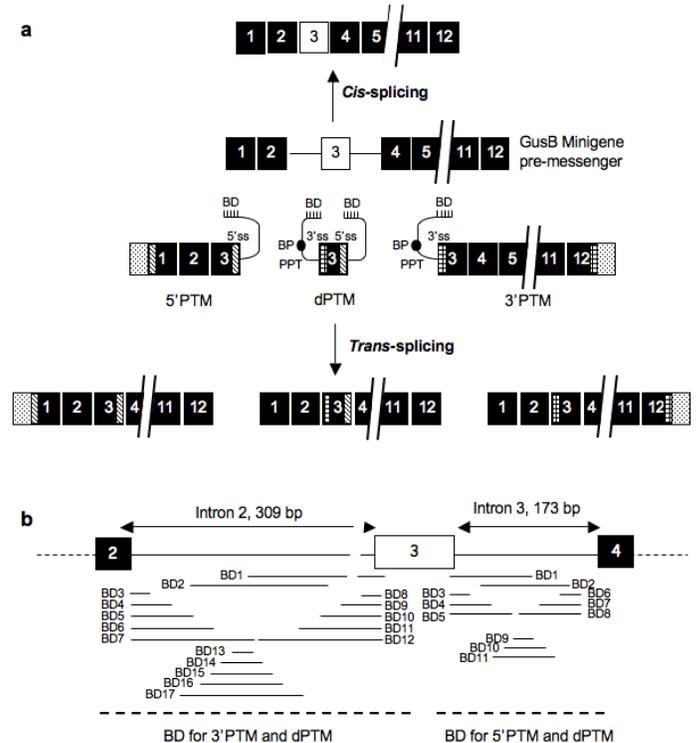
To facilitate *trans*-splicing event detection, a mutated canine GUSB minigene was constructed, made of the entire mutated canine GUSB cDNA, with introns 2 and 3 flanking the mutated exon 3 (Fig. 1a). The correct *cis*-splicing pattern of this mutated canine GUSB minigene was verified by transfection followed by RT-PCR analysis (data not shown).

Eleven 5'PTM, seventeen 3'PTM, and two dPTM were tested *in vitro* for the reprogramming of the GUSB pre-mRNA in canine MPS VII retinal pigmented epithelial (RPE) cells. The 5'PTM contained the normal canine GUSB-coding sequences for exons 1-3, a 5'ss, a spacer sequence, and a BD complementary to intron 3 of the GUSB pre-mRNA. The 3'PTM contained a BD complementary to intron 2, a spacer sequence, a branch point (BP) sequence, a polypyrimidine tract (PPT) sequence, a 3'ss, and the normal canine GUSB-coding sequences for exons 3-12. The dPTM contained a BD complementary to intron 2, a spacer sequence, a BP sequence, a PPT sequence, a 3' ss, the normal canine GUSB-coding sequences for exon 3, a 5' ss, a spacer sequence, and a BD complementary to intron 3 (Fig. 1a and Table S1). As the choice of BD appears to be critical for *trans*-splicing reaction efficiency and specificity [8], we designed thirty individual PTM containing 11 different BD for the 5'PTM, 17 different BD for 3'PTM and 2 different BD for dPTM (Fig. 1b). 5'PTM were associated with BD from 25 bp to 130 bp length, 3'PTM with BD from 25 bp to 200 bp length, and dPTM with BD from 100 bp to 200 bp length (Table S2).

To facilitate the discrimination between *cis*- and *trans*-spliced RNA molecules by RT-PCR, we degenerated 5'PTM, 3'PTM and dPTM coding sequences by modifying the third bp of the amino-acid coding triplets, but conserved the native genetic code. Degeneration was applied to the first thirty (5' end) and the last thirty (3' end) nucleotides of each PTM coding sequence (Fig. 1a). To facilitate detection of the *trans*-spliced resulting protein by Western blot, a 3xFlag tag was added upstream (5' end) and downstream (3' end) of each 5'PTM and 3'PTM, respectively. Because dPTM results in internal exon replacement, no tag could be added to these molecules (Fig. 1a).

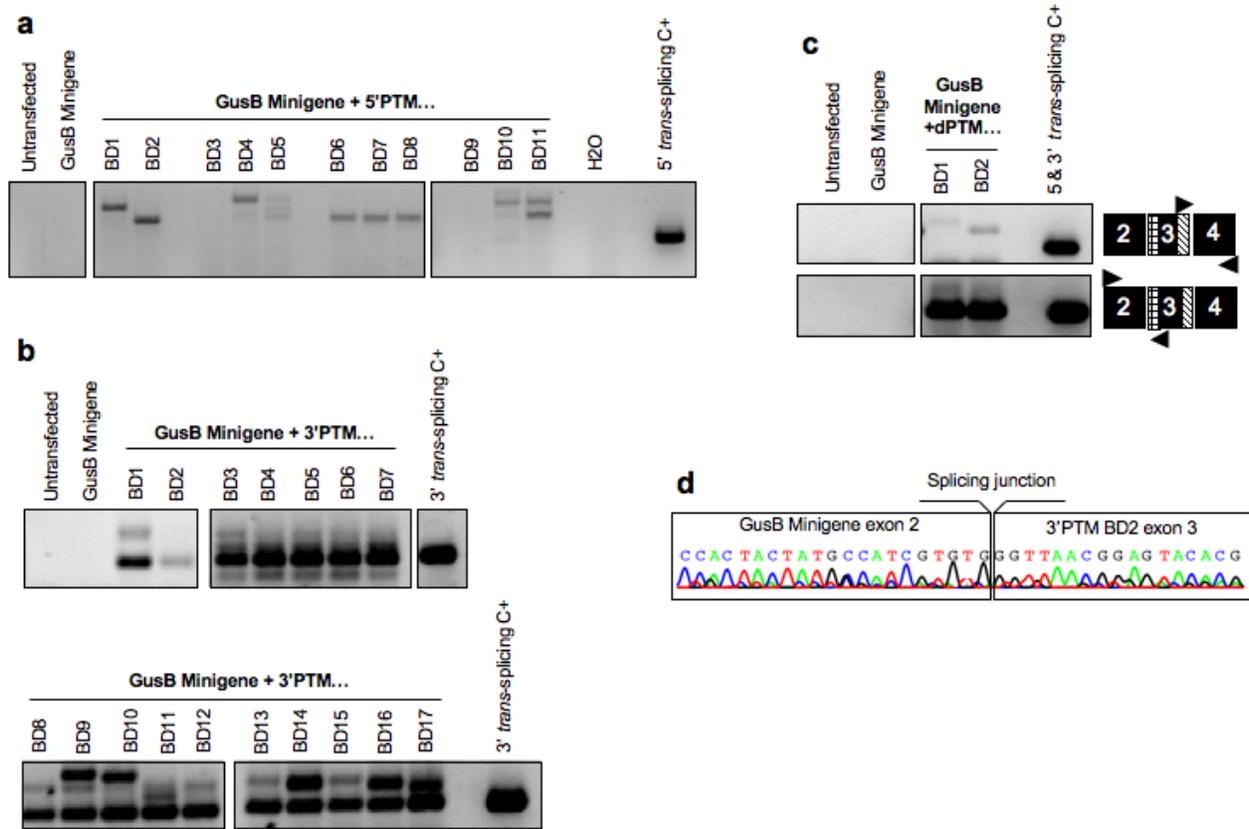
### Reprogramming of the mutated canine GUSB minigene using 5'PTM, 3'PTM or dPTM

5'PTM, 3'PTM and dPTM were co-transfected with the mutated canine GUSB minigene in canine MPS VII RPE cells. Forty-eight hours later, RNA was harvested and an RT-PCR specific for the *trans*-spliced molecules was performed. As shown Fig. 2a, each 5'PTM was able to react with the GUSB minigene target, except for 5'PTM BD3 and BD9. However, the experimental products had an unexpected larger size, compared to the positive control amplicon.



**Figure 1:** Schematic representation of the *trans*-splicing strategy used for the correction of the canine GUSB pre-mRNA. The mutated exon 3 is represented in white and the correct exons in black. (a) The GUSB minigene is composed of the entire canine mutated GUSB cDNA (carrying a G/A substitution in the 3<sup>rd</sup> exon), with introns 2 and 3 flanking the mutated exon 3. 5'PTM, 3'PTM, and dPTM were designed for the reprogramming of the canine GUSB target. Expected *cis* and *trans*-spliced product are represented. In each PTM, coding sequences were degenerated in 5' and 3', and a 3xFlag tag was added upstream of the 5'PTM coding sequence, and downstream of the 3'PTM coding sequence. 5' degenerated sequences are represented with diagonal lines, and 3' degenerated sequences are represented with horizontal lines. 3xFlag tag is represented by dots. (b) Schematic representation of sequences targeted by the different Binding Domains of the PTM in the canine GUSB pre-mRNA. BD: Binding Domain; BP: branch point sequence; PPT: polypyrimidine tract sequence; 3'ss: 3' splice site sequence; 5'ss: 5' splice site sequence.

Sequence analysis of the larger products revealed intronic inclusions within the coding sequence of the *trans*-spliced molecules. These inclusions were made of both GUSB minigene intron 3 and 5'PTM intron (data not shown). Using the 3'PTM, we showed the ability for each PTM to react with the GUSB minigene target (Fig. 2b). With 3'PTM BD2 to BD7, only one RT-PCR product was detected. Sequence analysis of this product confirmed that splicing occurred at the predicted splice sites between the target and the PTM (Fig. 2d). With the remaining 3'PTM (BD1 and BD8-BD17), in addition to the expected *trans*-spliced product, other forms were detected. Sequence analysis revealed that these additional products were made of intronic inclusions within the coding sequence of the *trans*-spliced molecules (data not shown). Finally, we demonstrated that dPTM were capable of a *trans*-splicing reaction with the GUSB minigene target (Fig. 2c). Indeed, and as confirmed by sequencing of the RT-PCR products, dPTM



**Figure 2:** Reprogramming of the canine mutated GUSB minigene using 5'PTM, 3'PTM, or dPTM. MPS VII RPE cells were co-transfected with the canine GUSB minigene and each 5'PTM, 3'PTM, or dPTM. Forty-eight hours later, RNA was isolated and submitted for *trans*-splicing-specific RT-PCR. (a) 5' *trans*-splicing RT-PCR analysis after transfection of 5'PTM. (b) 3' *trans*-splicing RT-PCR analysis after transfection of 3'PTM. (c) 3' *trans*-splicing RT-PCR analysis (upper panel) and 5' *trans*-splicing RT-PCR analysis (lower panel) after transfection of dPTM. (d) Sequencing of the RT-PCR product obtained after the co-transfection of the canine GUSB minigene and the 3'PTM BD2. C+: positive control.

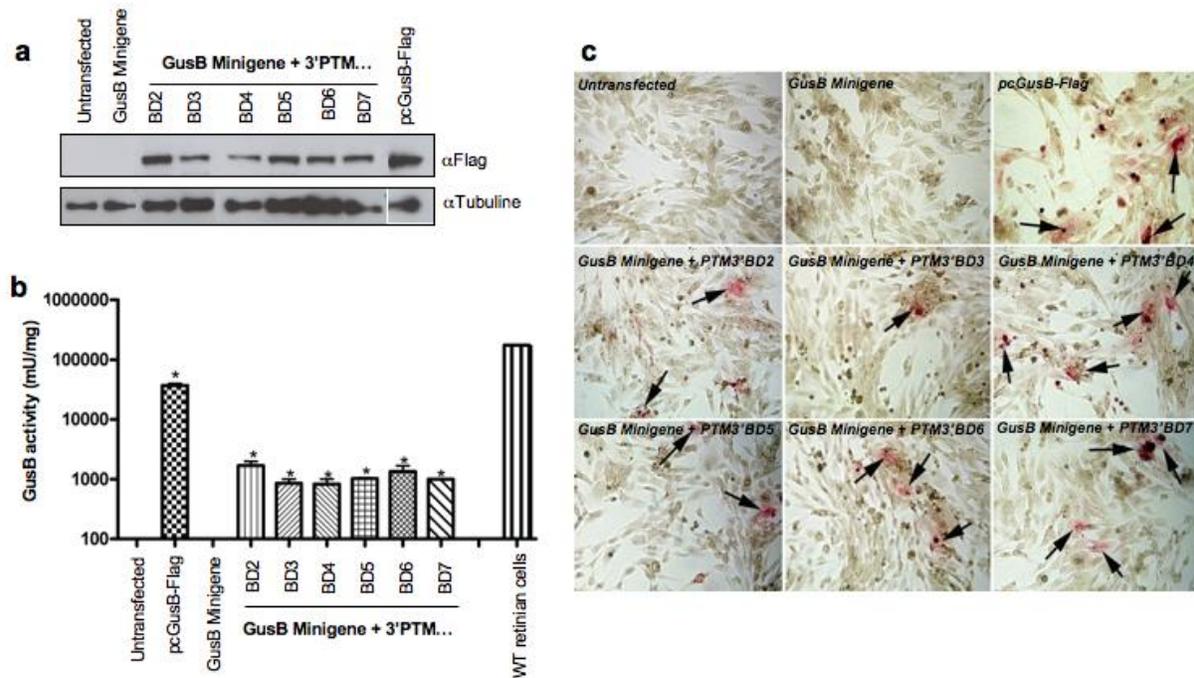
reacted as the corresponding 5'PTM and 3'PTM, i.e. dPTM BD1 reacted as the 5'PTM BD1 and the 3'PTM BD1, and dPTM BD2 reacted as the 5'PTM BD2 and the 3'PTM BD2 (data not shown).

To exclude the possibility of DNA recombination between the minigene target and PTM, 5'PTM, 3'PTM and dPTM were co-transfected with the GUSB minigene in canine MPS VII RPE cells. Total DNA was isolated and PCR performed with the same primers as above. No recombination event could be detected (data not shown).

Finally, to test if successfully *trans*-spliced messenger (mRNA) resulted in the presence of a functional GUSB protein, cell extracts were tested by Western-blot and GUSB enzymatic activity was determined. Using an anti-Flag antibody, a specific *trans*-spliced GUSB protein was detected by Western-blot (Fig. 3a). In addition, functional GUSB was detected (Fig. 3b and c). Altogether, these results demonstrated that, using 3'PTM, *trans*-splicing could generate *in vitro* a functional GUSB mRNA and protein.

### Reprogramming of the canine mutated endogenous GUSB using 5'PTM, 3'PTM or dPTM

To assess whether *trans*-splicing can be used to repair pre-mRNA expressed from endogenously expressed GUSB transcripts, we performed the same RT-PCR analysis on total RNA isolated from canine MPS VII RPE cells, transfected with our 5'PTM, 3'PTM or dPTM, in the absence of the GUSB minigene. Following the same RT-PCR protocol analysis as described above, we were not able to detect a successful splicing event on the endogenous GUSB target (data not shown). However, when PCR amplicons were further processed by Southern-blot, we found the predicted size product with the 5'PTM BD1 (Fig. 4a) and the 3'PTM BD1, BD2, BD7, BD8, BD11, BD12, BD16 and BD17 (Fig. 4b). For the remaining 5'PTM and 3'PTM, as well as for the dPTM, no product or a product at a lower size than those expected was seen (Fig. 4a-c). These results indicate that the *trans*-splicing reaction, when targeted to the endogenous sequence, is rather inefficient. Accordingly, we were not able to detect the protein either by



**Figure 3:** Co-transfection of canine GUSB minigene and 3'PTM BD2 to BD7 lead to the production of a functional GUSB protein. Canine MPS VII RPE cells were co-transfected with the canine GUSB minigene and the 3'PTM BD2 to BD7. Forty-eight hours later, total proteins were isolated and submitted to (a) anti-Flag or anti-Tubuline specific Western blots, and (b) GUSB enzymatic activity measurement. (c) Canine MPS VII RPE cells were transfected with the canine GUSB minigene and the 3'PTM BD2 to BD7. Forty-eight hours later, cells were submitted for GUSB chemical staining. Canine MPS VII RPE cells transfected with a plasmid encoding the canine GUSB protein carrying a 3xFlag-tag (pcGUSB-Flag) and wild-type human RPE cells were used as positive controls.

Western-blot or GUSB enzymatic activity measurement (data not shown). Of note, the same results were obtained in a different cell line derived from canine MPS VII hepatocytes.

### Evaluation of U7snRNA cloned downstream the 5'PTM, 3'PTM, and dPTM

U7snRNA is naturally part of the U7 small nuclear ribonucleoprotein (U7snRNP) complex involved in the processing of histone pre-mRNA and can be used to enhance splicing manipulation. We tested the effect of an engineered U7 snRNA molecule (U7 Opt) [31-34, 38] cloned downstream the 5'PTM, the 3'PTM, and the dPTM BD1 and BD2. The resulting PTM-U7 cassettes were cloned into an expression plasmid driven either by the CMV or by the natural U7 promoter. As above, they were transfected in canine MPS VII RPE cells and total RNA was subjected to RT-PCR analysis. Here, too, signal detection had to be enhanced using a Southern-blot to detect the amplicons. We showed unambiguously that U7 Opt increased the *trans*-splicing reaction efficiency of the 5'PTM BD1 and BD2 (Fig. 5a and data not shown). This increase was observed regardless of the promoter driving the expression of the PTM-U7. However, the levels of corrected GUSB pre-mRNA obtained were still not sufficient to allow the detection of a corrected GUSB protein (Fig. 5b). In contrast, using 3'PTM and dPTM, the presence of the U7 Opt did not impact on the

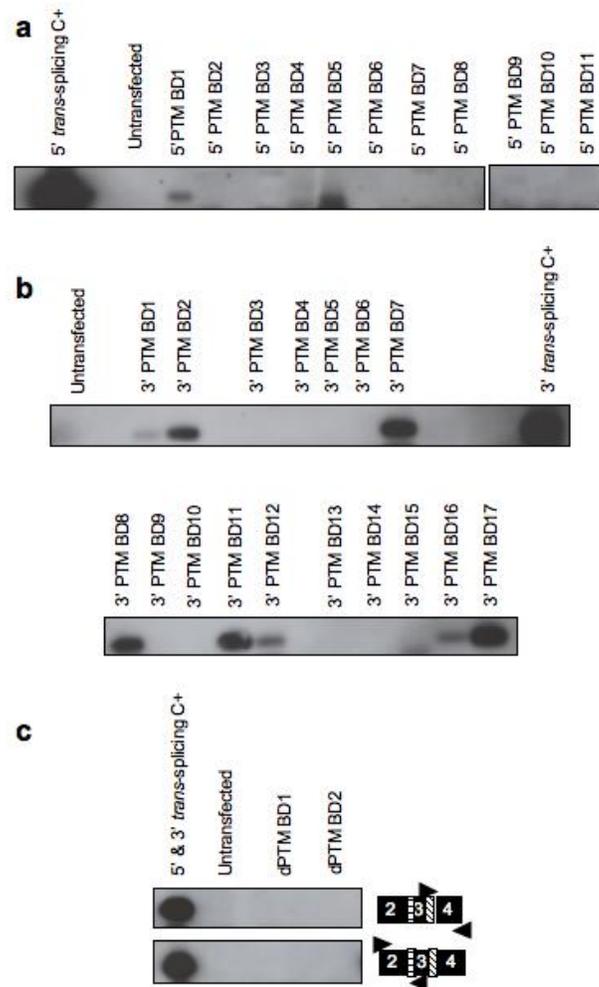
efficiency of the *trans*-splicing reaction (Fig. 5a,b and data not shown).

Interestingly, the presence of the U7 Opt had no impact on the *trans*-splicing reaction in the presence of the GUSB minigene, regardless of the PTM (5'PTM, 3'PTM or dPTM) (data not shown). Also, using the 3'PTM-U7 resulted in a decrease of corrected GUSB protein as compared to the 3'PTM alone (Fig. S1). Altogether, the addition of the U7-Opt was not therapeutically relevant against the GUSB target.

### Evaluation of bifunctional RNA on 3'PTM *trans*-splicing efficiency

An alternative way to increase *trans*-splicing reaction efficiency is to use splicing enhancers. Bifunctional RNA are a class of oligonucleotides that contain two functional domains: an RNA sequence that is complementary to a specific targeted RNA and an RNA sequence that contains exonic splicing enhancer (ESE) motifs to provide cellular splicing enhancers, such as SR and SR-like proteins [32-37]. In the context of a *trans*-splicing reaction, adding splicing activators in the direct environment of the PTM could facilitate the PTM recruitment by the spliceosome, leading to better *trans*-splicing efficiency (Fig. 6a). The adjuvant effect of bifunctional RNA was tested using the 3'PTM BD2 and BD7 (see Fig. 4b). To obtain bifunctional RNA that were specific to these PTM and not to the target GUSB

canine model



**Figure 4:** Test of 5'PTM, 3'PTM and dPTM on the endogenous GUSB pre-mRNA. MPS VII RPE cells were transfected with 5'PTM, 3'PTM or dPTM. Forty-eight hours later, RNA was isolated submitted to *trans*-splicing specific RT-PCR, followed by Southern-blot, using specific probes for the *trans*-spliced products. (a) 5' *trans*-splicing RT-PCR analysis after transfection of 5'PTM. (b) 3' *trans*-splicing RT-PCR analysis after transfection of 3'PTM. (c) 3' *trans*-splicing RT-PCR analysis (upper panel) and 5' *trans*-splicing RT-PCR analysis (lower panel) after transfection of dPTM. C+: positive control.

pre-mRNA, we designed oligonucleotides carrying a sequence complementary (or bifunctional Binding Domain, bif-BD) to the degenerated part of the coding sequence of the PTM. The second domain of the bifunctional RNA carried recognition motifs for SF2/ASF and SC35 proteins [33] (**Fig. 6a,b**). 5' and 3' oriented bifunctional RNA were tested; i.e. a 5' bifunctional RNA carried the bif-BD in 5', whereas, a 3' bifunctional RNA carried the bif-BD in 3'. For each bifunctional RNA, five SR protein recognition sequences were cloned in tandem (**Fig. 6b**). Controls consisted of bif-BD alone, SF2/ASF recognition motifs alone, or SC35 recognition motifs alone. All bifunctional RNA were expressed under the control of the polymerase III-dependant H1 promoter.

The resulting plasmids were co-transfected with the 3'PTM BD7 in canine MPS VII RPE cells and total RNA was subjected to RT-PCR analysis. The bifunctional RNA carrying the SF2/ASF recognition motifs increased the *trans*-splicing reaction efficiency of the 3'PTM BD7 on the endogenous GUSB pre-mRNA. This improvement was also observed when the bif-BD alone was used but was surprisingly not observed with the bifunctional RNA carrying the SC35 recognition motifs (**Fig. 6c**). These results were clearly visible after an analysis by Southern-blot, but the *trans*-splicing products were also, for the first time in this study, directly detectable after electrophoresis on an agarose gel (**Fig. 6c**). However, again the levels of corrected GUSB pre-mRNA were not sufficient to allow the detection of the corrected GUSB protein (**Fig. 6d**). The same results were observed when using the 3'PTM BD2 (data not shown).

## DISCUSSION

Previous studies investigated *trans*-splicing corrections with 5'PTM [5] or 3'PTM [6-13, 14, 15, 16]. Here, we tested if correction of the GUSB pre-mRNA was possible *in vitro*, using three types of PTM: 5'PTM, 3'PTM and dPTM, the later allowing the replacement of an internal exon. As the choice of BD appears to be critical for the efficiency and specificity of the *trans*-splicing reaction [8], we designed several individual PTM containing different BD sequences. We first evaluated the reprogramming of a mutated GUSB pre-mRNA target expressed from a minigene. This approach allowed the evaluation of efficacy and specificity of the *trans*-splicing reaction in an optimal context for an easier detection. Using several 3'PTM, we demonstrated the feasibility of *trans*-splicing to repair this GUSB pre-mRNA, and restore the expression of a functional GUSB protein. However, 5'PTM and dPTM were not able to achieve such correction. Indeed, if *trans*-spliced products were detected with these PTM, the reaction was essentially non-specific and generated intronic inclusions in the mRNA product. We then tested the ability of our different PTM to correct the endogenous canine defective GUSB pre-mRNA in canine MPS VII RPE cells. Western-blot analysis and detection of the GUSB activity were not conclusive, despite detectable specific *trans*-splicing events with one 5'PTM and some 3'PTM after RT-PCR followed by Southern-blot analysis. Surprisingly, when the results obtained with the minigene or the endogenous GUSB pre-mRNA substrats were compared, several differences were noted. Indeed, among the 3'PTM, 3'PTM BD2 and BD7 displayed a specific *trans*-splicing profile in both contexts, 3'PTM BD1, BD8, BD11, BD12, BD16, and BD17 showed specific and non-specific *trans*-splicing against the minigene target, but only specific *trans*-splicing was seen when challenged with the endogenous pre-mRNA target. Furthermore, if a specific *trans*-splicing pattern was obtained when 3'PTM BD3, BD4, BD5, BD6, BD9, BD10, BD13, BD14, and BD15 were co-transfected with the canine GUSB minigene, they were all inefficient against the endogenous target.

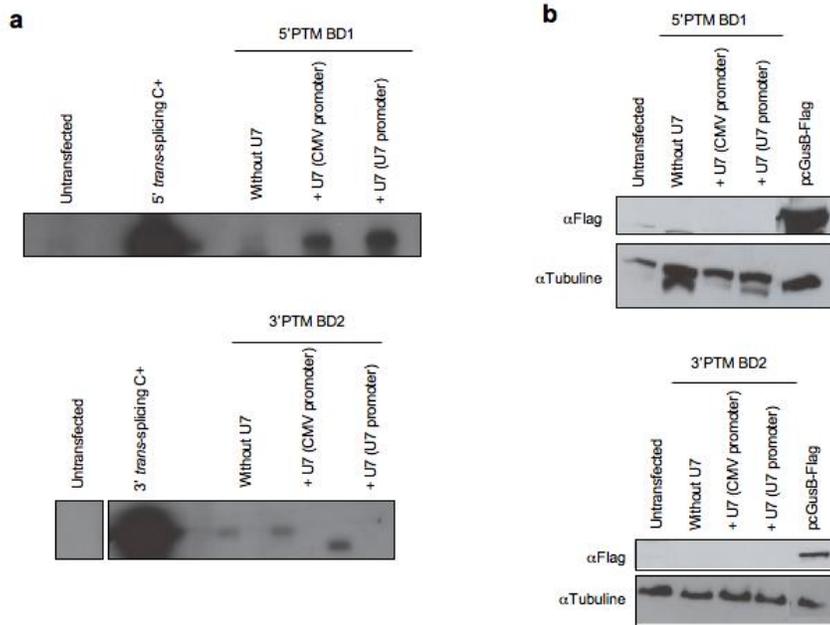


Figure 5: Test of the adjuvant effect of U7snRNA on the *trans*-splicing efficiency. 5'PTM BD1 and BD2 and 3'PTM BD1 and BD2 were cloned between the CMV promoter and SV40 polyadenylation signal (without U7), between the CMV promoter and U7 Opt (+ U7 (CMV promoter)) or between the U7snRNA promoter and U7 Opt (+ U7 (U7 promoter)). MPS VII RPA cells were transfected with these PTM. The results obtained with the 5'PTM BD1 and the 3'PTM BD2 are presented. (a) Forty-eight hours later, RNA was isolated and submitted to *trans*-splicing-specific RT-PCR, followed by Southern-blot using specific probes for the *trans*-spliced products. (b) Forty-eight hours later, total protein was isolated and submitted to anti-Flag or anti-Tubuline-specific Western blots. As a positive control, the cells were transfected with a plasmid encoding the canine GUSB protein carrying a 3xFlag-tag (pcGUSB-Flag). C+: positive control.

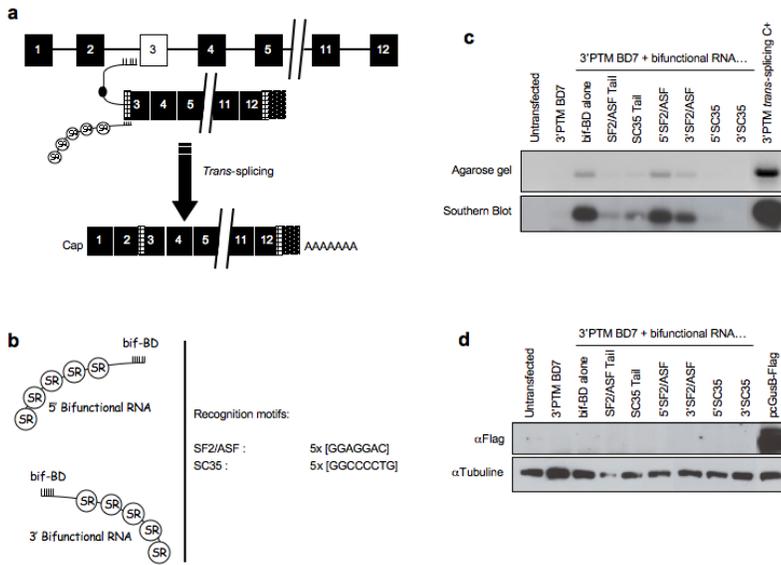
One hypothesis is that the minigene context provides a non-physiological environment for the targeted exon 3 to be processed correctly. Indeed, the minigene that we used was composed of the entire canine GUSB cDNA in which only two introns flank exon 3. Therefore, upstream and downstream introns were lacking. However, accurate splice site recognition in pre-mRNA occurs through initial exon and intron recognitions [40, 41], but the presence of a splice site does not necessarily result in the use of that particular splice site. The choice is governed by the association of protein factors with specific sequences on the pre-mRNA, in a manner that can positively or negatively affect the assembly of the spliceosome machinery and splice site usage. Secondary structures can also expose a splice site, or to the contrary, hide it. Exon and intron definitions take place along the entire pre-mRNA. Some folding of the RNA molecule or some RNA-protein or protein-protein interactions in a given intron can affect the splicing of a non-adjacent exon located downstream or upstream [40, 41]. In these circumstances, as the PTM were challenged either in the minigene or the endogenous context, the recognition of PTM and GUSB target splice sites were likely not comparable, resulting in heterogeneous *trans*-splicing reaction specificity. In addition, the secondary structures of targets and, thus, the specificity of the *trans*-splicing reaction could be also different in these two environments.

Altogether our study indicates that the efficiency and specificity of a given PTM in a minigene context is rather unpredictable of what can actually occur on the same pre-mRNA but in the endogenous context. Yet, many studies have used a minigene to validate the efficiency and specificity of different PTM [5-8, 12,

15-17]. We believe that such restricted screening of PTM is of low relevance and requires further characterization by testing the endogenous pre-mRNA target.

In the endogenous context, where the GUSB pre-mRNA is physiologically expressed (whereas it is over-expressed in the minigene context) no reprogrammed protein was detected suggesting that the efficiency of the *trans*-splicing reaction seems to be a major limiting factor. In other models, efficiency of *trans*-splicing reactions was documented to be 1% to 6% of total target mRNA [10, 11, 17, 19], thus, the amount of *trans*-spliced mRNA (and then of corrected protein) detected was rather low. Even if the same number of BD for each type of PTM was not tested, analysis by RT-PCR + Southern-blot revealed that 3' exon replacement seemed to be a more efficient process than 5' exon replacement, which in turn seemed to be more efficient than internal exon replacement using dPTM. Only one study used 5'PTM previously, and their efficiency was not compared to those of 3'PTM [5]. However, as the definition of exons and introns and the accessibility of the sequences complementary to BD can be different in various pre-mRNA, we cannot generalize on the relative efficiency of 5'PTM versus 3'PTM versus dPTM.

To improve the efficiency of the *trans*-splicing reaction, we designed several individual PTM containing different BD sequences. In the endogenous context, 5'PTM BD1 and 3'PTM BD1, BD2, BD7, BD8, BD11, BD12, BD16, and BD17 appeared to be the most efficient molecules. Except for 3'PTM BD8, this result was consistent with previous observations showing that long BD confer higher efficiency to PTM[8].



**Figure 6: Test of the adjuvant effect of bifunctional RNA on *trans*-splicing efficiency. (a) Schematic representation of the *trans*-splicing strategy using bifunctional RNA. Bifunctional RNA, specific for the degenerated part of the 3'PTM, was able to hybridize to the 3'PTM but not on its target. The recruiting of SR proteins in the environment of the PTM could increase its recognition and its coverage by the spliceosome machinery and then improve *trans*-splicing efficiency. (b) 5' and 3' bifunctional RNA were designed to recruit SF2/ASF or SC35 splicing factors. Five recruiting domains were cloned in tandem. MPS VII RPE cells were co-transfected with 3'PTM BD7 and bifunctional RNA. (c) Forty-eight hours later, RNA was isolated and submitted for *trans*-splicing-specific RT-PCR, followed by Southern-blot using specific probes for the *trans*-spliced products. (d) Forty-eight hours later, total proteins were isolated and submitted for anti-Flag- or anti-Tubuline-specific Western blots. As a positive control, the cells were transfected with a plasmid encoding the canine GUSB protein carrying a 3xFlag-tag (pcGUSB-Flag). Bif-BD: binding domain of the bifunctional RNA; C+: positive control.**

Another method to improve *trans*-splicing efficiency is to concentrate PTM in the splicing sites of the nucleus using a modified U7snRNA, called U7 Opt [42]. In our hands, the addition of U7 Opt downstream of the PTM increased the efficiency of 5' *trans*-splicing only. However, this increase was not sufficient to allow the detection of a corrected GUSB protein. Moreover, when added downstream of the 3'PTM, U7 Opt caused a decrease of *trans*-splicing of the resulting protein. This is consistent with a previous observation showing that the presence of U7 Opt downstream of bifunctional RNA resulted in an increase of exon 7 inclusion in the SMN2 mRNA but in a weak increase of full length protein when compared to normal fibroblasts [33]. We believe that the presence of U7 Opt downstream of the 3' *trans*-spliced RNA modified the recruitment of factors involved in the export and/or translation initiation. Utility of U7 Opt downstream 3'PTM was then compromised. This was not the case for 5' and double PTM since their splicing reaction lead to U7 Opt excision from the mature *trans*-spliced RNA. However, in our hands, adding U7 Opt downstream to 5' and double PTM was not sufficient to achieve therapeutically relevant *trans*-splicing levels.

Finally, we investigated the use of bifunctional RNA to promote the efficiency of the *trans*-splicing reaction. In our model, the bifunctional RNA binding domain (bif-BD) alone was sufficient to increase 3' *trans*-splicing efficiency. Previous studies showed the possibility to increase the inclusion of SMN2 exon 7 using an antisense oligonucleotide lacking the SR tail by blocking an Exonic Splicing Silencer (ESS) recognition motif on the target [35, 43, 44]. *In silico* analysis (<http://ast.bioinfo.tau.ac.il/>) of degenerated *versus* natural canine GUSB exon 3 sequences suggested that degenerating the 5' coding sequences of our 3'PTM lead to the generation of an ESS recognition motif. The bif-BD hybridization on these sites may block the ESS recruitment, allowing a better reaction efficiency. More, the fact that SC35 bifunctional RNA was less efficient than bif-BD alone

was surprising, but could be explained by blockage by way of their specific secondary structures, as suggested by *in silico* analysis ([www.genebee.msu.su/](http://www.genebee.msu.su/)).

In conclusion, while RNA repair using *trans*-splicing has many theoretical advantages when compared to existing conventional gene replacement therapies, our results indicate that the technology has to improve substantially before any translational testing can occur in a large animal model.

## MATERIALS AND METHODS

**Recombinant plasmids.** 5'PTM, 3'PTM and dPTM were first cloned into the pUC19 plasmid (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), using annealed oligonucleotides or PCR amplicons (tables S1 and S2). The structure of all PTM was confirmed by complete sequencing. Then, PTM were subcloned in an expression plasmid, i.e. between the CMV promoter and an polyA sequences in the pcDNA3.1-Hygro-LacZ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), between the CMV promoter and the U7 Opt sequences in pCI-U7 Opt or between the U7snRNA promoter and the U7 Opt sequences in the pUM1-U7 Opt (pCI-U7 Opt and pUM1-U7 were kindly provided by Richard Breathnach, INSERM UMR 892, Nantes, France). The GUSB minigene was made of the entire mutated canine GUSB cDNA, with introns 2 and 3 flanking the mutated exon 3. The GUSB genomic sequence from exon 2 to exon 4 (containing introns 2 and 3 sequences) was amplified from genomic DNA of canine RPE cells, and inserted in the GUSB cDNA in place of the exon 2 to 4 sequence. The final GUSB minigene was subcloned the pCI-Neo plasmid (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). pCAG-GUSB-Flag consisted of the entire canine GUSB cDNA upstream to which 3xFlag Tag was added 5' of the ATG codon, under the control of the CAG promoter and the rabbit  $\beta$ -globin polyadenylation signal. For 5' and 3' *trans*-splicing RT-PCR control plasmids (C+), 5' and 3' specific *trans*-splicing PCR

canine model

primers (see below) were used to amplify some part of the GUSB cDNA. As in each reaction, one primer was specific for degenerated sequences, a low melting temperature was used. The resulting amplicons were subcloned in the pCI-Neo plasmid (Promega, Charbonnières-les-bains, France). Finally, bifunctional RNA were cloned between ClaI and MluI restriction sites of the pLV-THM plasmid (kindly provided by Didier Trono, EPFL, Lausanne, Switzerland). The structure of all plasmids was confirmed by sequencing. Readers are encouraged to contact us to obtain more detailed information on the construction of the recombinant plasmids.

**Cell culture and transfection.** We used canine MPS VII RPE cells, which are mutated in the third exon of the canine GUSB by a G to A substitution [26]. Cells were cultured at 37°C in an humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Hyclone, Brebières, France) and 1% v/v penicillin/streptomycin (Lonza, Levallois-Perret, France). Twenty-four hours prior to transfection, 5 x 10<sup>5</sup> canine MPS VII RPE cells were seeded in six-well plates. Cells were transfected with 2,5µg of total DNA using Lipofectamine (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. In the case of co-transfection of PTM and the GUSB minigene, 1,5µg of PTM was co-transfected with 1µg of GUSB minigene. When PTM were co-transfected with bifunctional RNA, 1,25µg of PTM was transfected with 1,25µg of bifunctional RNA, and finally, when PTM were co-transfected with bifunctional RNA and the GUSB minigene, 1µg of PTM was transfected with 1µg of bifunctional RNA and 0,5µg of GUSB minigene. Single transfection controls (5' trans-splicing C+, 3' trans-splicing C+, or pCAG-cGUSB-Flag) consisted of 0,5µg of control plasmid normalized to 2,5µg with a mock plasmid. Cells were maintained 48 hours at 37°C before harvesting genomic DNA, total RNA, or total proteins. Importantly, to confirm the reproducibility of our results, all transfections and analysis were done at least three times.

**RNA purification and reverse transcription.** Total RNA was extracted according to the standard Chomczynski and Sacchi protocol [45]. 10µg of RNA underwent DNase treatment using the Turbo DNA free kit (Ambion, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 1µg of DNase-treated RNA using the MLV-RT (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and a poly-dT primer (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom), according to the manufacturer's instruction. For the U7snRNA experiments, a GUSB specific primer was used (5' CTCACCTCCAACGAGTACAG 3') for the reverse transcription.

**PCR.** PCR analysis were performed using the Go-Taq polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Except in U7snRNA experiments, a control RT-PCR specific for Actin mRNA was used to control for the integrity of each cDNA or DNA using primers forward 5'

TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA 3' and reverse 5' CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG 3' (30 cycles, 1 minute 94°C, 1 minute 55°C, 1 minute 72°C). Samples from transfections of 5'PTM and dPTM were submitted to a 5' trans-splicing specific PCR using primers forward 5' GGTACAATAGTGTATAAAACCGAT 3' and reverse 5' AGTGTCTTGGTCCACGCCGGT 3' (35 cycles: 30sec 94°C, 30sec 60°C, 30sec 72°C). Samples from transfections of 3'PTM and dPTM were submitted to a 3' trans-splicing specific PCR using primers cGUSB ex2 Upper 5' GGGCACGAGAGTGGTGCTGAGGATT 3' and dGUSB ex3 deg Lower 5' ATGTTACAGCTACGTGTACTCCGTTA 3' (35 cycles: 30sec 94°C, 30 sec 65°C, 30 sec 72°C).

**Southern blot.** When needed, RT-PCR products were transferred under alkaline conditions to nylon filters (Hybond N+, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom), and hybridized with 5' or 3' trans-splicing specific probes labeled with alkaline phosphatase (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom). Revelation was performed using CDP-Star (Roche Applied Science, Meylan, France) according to the manufacturer's instructions.

**Protein extraction.** Cells were trypsinized, washed twice in NaCl 0,9%, and lysed in NaCl 0,9% containing 0,2% Triton X-100. Supernatant was collected, and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Applied Science, Meylan, France) were added. Protein concentration was determined using a BCA assay (Biorad, Marnes-la-coquette, France).

**Western Blot.** 100µg of protein were subjected to sodium dodecyl sulfate–10% polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom). Membranes were then saturated in PBS, Tween 0,1%, Milk 5%, overnight at 4°C, and subsequently incubated for one hour at room temperature either with an anti-Flag M2 antibody (Sigma-Aldrich, Lyon, France) or an anti-Tubuline antibody (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Detection used a peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Dako, Trappes, France) followed by enhanced chemiluminescence detection (ECL, Pierce, Brebières, France).

**GUSB activity measurement.** 50µg of protein were tested for GUSB enzymatic activity in 100mM 4-Methylumbelliferyl β-D-Glucuronide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 1h at 37°C, as previously described [46]. One unit of enzyme activity released 1 nmole of 4-methylumbelliferone per milligram of protein.

**GUSB chemical staining.** GUSB was identified histochemically using naphthol-AS-BI-β-D-glucuronide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and pararosaniline hydrochloride (Sigma-Aldrich, Lyon, France) with a 4h preincubation at 4°C in substrate alone and a 12h incubation at 37°C in the presence of substrate and pararosaniline hydrochloride, as described previously [47].

canine model

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Eric Marcouyeux for help with plasmid construction and Mark E. Haskins for manuscript review. Financial support came from the INSERM, the ANR, the University Hospital of Nantes, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire, CLINIGENE (a European Network of Excellence), and the AFM (Association Française contre les Myopathies).

## REFERENCES

- Wood M, Yin H, and McClorey G (2007). Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet*; **3**: e109.
- Garcia-Blanco MA (2003). Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Clin Invest*; **112**: 474-480.
- Mansfield SG, Chao H, and Walsh CE (2004). RNA repair using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Trends Mol Med*; **10**: 263-268.
- Yang Y, and Walsh CE (2005). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther*; **12**: 1006-1012.
- Mansfield SG, Clark RH, Puttaraju M, Kole J, Cohn JA, Mitchell LG, et al. (2003). 5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Rna*; **9**: 1290-1297.
- Puttaraju M, Jamison SF, Mansfield SG, Garcia-Blanco MA, and Mitchell LG (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol*; **17**: 246-252.
- Mansfield SG, Kole J, Puttaraju M, Yang CC, Garcia-Blanco MA, Cohn JA, et al. (2000). Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther*; **7**: 1885-1895.
- Puttaraju M, DiPasquale J, Baker CC, Mitchell LG, and Garcia-Blanco MA (2001). Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther*; **4**: 105-114.
- Kikumori T, Cote GJ, and Gagel RF (2001). Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy? *Hum Gene Ther*; **12**: 1429-1441.
- Liu X, Jiang Q, Mansfield SG, Puttaraju M, Zhang Y, Zhou W, et al. (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol*; **20**: 47-52.
- Liu X, Luo M, Zhang LN, Yan Z, Zak R, Ding W, et al. (2005). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther*; **16**: 1116-1123.
- Rodriguez-Martin T, Garcia-Blanco MA, Mansfield SG, Grover AC, Hutton M, Yu Q, et al. (2005). Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102**: 15659-15664.
- Coady TH, Shababi M, Tullis GE, and Lorson CL (2007). Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing. *Mol Ther*; **15**: 1471-1478.
- Zayed H, Xia L, Yerich A, Yant SR, Kay MA, Puttaraju M, et al. (2007). Correction of DNA Protein Kinase Deficiency by Spliceosome-mediated RNA Trans-splicing and Sleeping Beauty Transposon Delivery. *Mol Ther*; **15**: 1273-1279.
- Chen HY, Kathirvel P, Yee WC, and Lai PS (2008). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther*.
- Coady TH, Baughan TD, Shababi M, Passini MA, and Lorson CL (2008). Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS ONE*; **3**: e3468.
- Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, Hiriyanna S, Mitchell LG, Garcia-Blanco MA, et al. (2003). Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med*; **9**: 1015-1019.
- Bhaumik S, Walls Z, Puttaraju M, Mitchell LG, and Gambhir SS (2004). Molecular imaging of gene expression in living subjects by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**: 8693-8698.
- Tahara M, Pergolizzi RG, Kobayashi H, Krause A, Luettich K, Lesser ML, et al. (2004). Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat Med*; **10**: 835-841.
- Walls ZF, Puttaraju M, Temple GF, and Gambhir SS (2008). A generalizable strategy for imaging pre-mRNA levels in living subjects using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Nucl Med*; **49**: 1146-1154.
- Wang J, Mansfield SG, Cote CA, Jiang PD, Weng K, Amar MJ, et al. (2008). Trans-splicing Into Highly Abundant Albumin Transcripts for Production of Therapeutic Proteins In Vivo. *Mol Ther*.
- Nakayama K, Pergolizzi RG, and Crystal RG (2005). Gene transfer-mediated pre-mRNA segmental trans-splicing as a strategy to deliver intracellular toxins for cancer therapy. *Cancer Res*; **65**: 254-263.
- Desnick RJ, and Schuchman EH (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet*; **3**: 954-966.
- Haskins ME, Desnick RJ, DiFerrante N, Jezyk PF, and Patterson DF (1984). Beta-glucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII. *Pediatr Res*; **18**: 980-984.
- Ray J, Bouvet A, DeSanto C, Fyfe JC, Xu D, Wolfe JH, et al. (1998). Cloning of the canine beta-glucuronidase cDNA, mutation identification in canine MPS VII, and retroviral vector-mediated correction of MPS VII cells. *Genomics*; **48**: 248-253.
- Ray J, Scarpino V, Laing C, and Haskins ME (1999). Biochemical basis of the beta-glucuronidase gene defect causing canine mucopolysaccharidosis VII. *J Hered*; **90**: 119-123.

canine model

27. Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B, et al. (1989). Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta-glucuronidase deficiency. *J Clin Invest*; **83**: 1258-1266.
28. Jain S, Drendel WB, Chen ZW, Mathews FS, Sly WS, and Grubb JH (1996). Structure of human beta-glucuronidase reveals candidate lysosomal targeting and active-site motifs. *Nat Struct Biol*; **3**: 375-381.
29. Wong AW, He S, Grubb JH, Sly WS, and Withers SG (1998). Identification of Glu-540 as the catalytic nucleophile of human beta-glucuronidase using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem*; **273**: 34057-34062.
30. Islam MR, Tomatsu S, Shah GN, Grubb JH, Jain S, and Sly WS (1999). Active site residues of human beta-glucuronidase. Evidence for Glu(540) as the nucleophile and Glu(451) as the acid-base residue. *J Biol Chem*; **274**: 23451-23455.
31. Goyenvalle A, Vulin A, Fougereusse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, et al. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*; **306**: 1796-1799.
32. Madocsai C, Lim SR, Geib T, Lam BJ, and Hertel KJ (2005). Correction of SMN2 Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol Ther*; **12**: 1013-1022.
33. Marquis J, Meyer K, Angehrn L, Kampfer SS, Rothen-Rutishauser B, and Schumperli D (2007). Spinal muscular atrophy: SMN2 pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol Ther*; **15**: 1479-1486.
34. Marquis J, Kampfer SS, Angehrn L, and Schumperli D (2008). Doxycycline-controlled splicing modulation by regulated antisense U7 snRNA expression cassettes. *Gene Ther*.
35. Cartegni L, and Krainer AR (2003). Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol*; **10**: 120-125.
36. Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, and Muntoni F (2003). Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**: 4114-4119.
37. Baughan T, Shababi M, Coady TH, Dickson AM, Tullis GE, and Lorson CL (2006). Stimulating full-length SMN2 expression by delivering bifunctional RNAs via a viral vector. *Mol Ther*; **14**: 54-62.
38. Gorman L, Suter D, Emerick V, Schumperli D, and Kole R (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**: 4929-4934.
39. Zaldumbide A, and Hoeben RC (2008). How not to be seen: immune-evasion strategies in gene therapy. *Gene Ther*; **15**: 239-246.
40. Berget SM (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem*; **270**: 2411-2414.
41. Schellenberg MJ, Ritchie DB, and MacMillan AM (2008). Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci*; **33**: 243-246.
42. Viles KD, and Sullenger BA (2008). Proximity-dependent and proximity-independent trans-splicing in mammalian cells. *Rna*; **14**: 1081-1094.
43. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, and Krainer AR (2007). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol*; **5**: e73.
44. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, and Krainer AR (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet*; **82**: 834-848.
45. Chomczynski P, and Sacchi N (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*; **1**: 581-585.
46. Glaser JH, and Sly WS (1973). Beta-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis: methods for enzymatic diagnosis. *J Lab Clin Med*; **82**: 969-977.
47. Sands MS, Vogler C, Kyle JW, Grubb JH, Levy B, Galvin N, et al. (1994). Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII. *J Clin Invest*; **93**: 2324-2331.

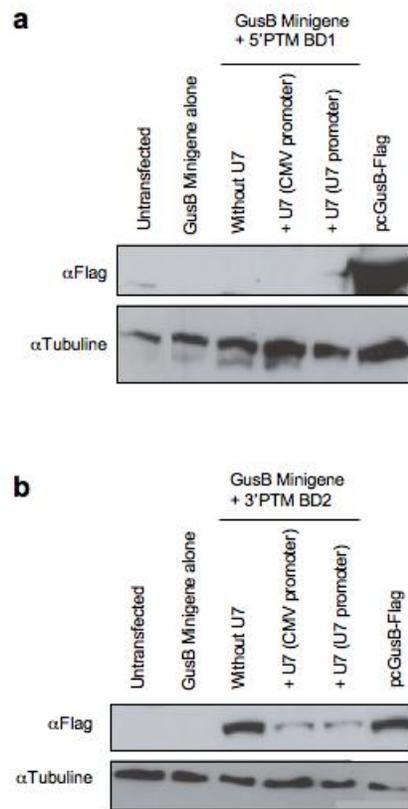


Figure S1: Test of the adjuvant effect of U7snRNA on the *trans*-splicing efficiency in the canine GUSB minigene context. 5'PTM BD1 and BD2, and 3'PTM BD1 and BD2 were cloned between the CMV promoter and SV40 polyadenylation signal (Without U7), between the CMV promoter and U7 Opt (+ U7 (CMV promoter)) or between the U7snRNA promoter and U7 Opt (+ U7 (U7 promoter)). MPS VII RPE cells were co-transfected with the GUSB minigene and the PTM. Forty-eight hours later, total proteins were isolated and submitted for anti-Flag- or anti-Tubuline-specific Western blots. As a positive control, the cells were transfected with a plasmid encoding the canine GUSB protein carrying a 3xFlag-tag (pcGUSB-Flag). (a) Results obtained with the 5'PTM BD1. (b) Results obtained with the 3'PTM BD2.

Structure	Polylinker restriction sites	Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pUC19		
				PCR / Annealing	Sites	
<b><i>Polylinker</i></b>	NdeI - PmeI - AvrII - PacI - AscI - NotI - RsrII - AgeI - SacII XhoI - SbfI - SwaI - NruI - FesI	On demand	On demand	Annealing	NdeI-HindIII	
Structure	5'PTM 5'ss	3'PTM 3'ss	Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pUC19 + polylinker	
					PCR / Annealing	Sites
<b><i>5'PTM</i></b>						
Spacer			TCGAGTATCACCGATATGT GTCTAACCTGATTCGGGCC TTCGATACGCTAAGATCCA CCGCGTCAAACAAGTTTTA TTT	AAATAAACTTGTITGACG CGGTGGATCTTAGCGTATC GAAGGCCCGAATCAGGTT AGACACATATCGGTGATAC	Annealing	XhoI-SmaI
Exon 1 - 3	CAA/GTAAGT		CGTACCGGTTCCAGTGGGA CCCCTGGAGCTTGGGTC GCACTCGGCCCGCT	AGCCTCGAGACTTACTTCG AGGCATCGGTTTATACAC TATTGTACCTGGCGGCAGA	PCR	AgeI-XhoI
3xFlag Tag			GGCCGCATGGATTACAAG GATGACGACGATAAGGAC TATAAGGACGATGATGACA AGGACTACAAAGATGATG ACGATAAAT	CCGATTATCGTCATCAT CTTTGTAGTCCTTGTATC ATCGTCCTTATAGTCCTTAT CGTCGTCATCCTTGTAAATC CATGC	Annealing	NotI-AgeI
<b><i>3'PTM</i></b>						
Spacer - Branch Point			TAATTCGAGCAGCTTATAT AATGTTCTGACTCGC	GGCCGCGAGTCAGAACAT TATATAACGTGCTCGAATT AAT	Annealing	PacI-NotI
PPT			GGCCGCTCTCTTTTTTTTT TTA	CCGGTAAAAAAAAAAGAA GAGC	Annealing	NotI-AgeI
Exon 3 - 12		GCAG/TG	CGTTCGGGAGCAGTGGGT TAACGGAGTACACGTAGC TGAACATGAGGGGGTCA	TCCGTCGACGCA <del>T</del> AGTGC AAATGGAGAATTCTCTAA GCACTGGGACTT	PCR	AgeI-XhoI
3xFlag Tag			TCGAGGATTACAAGGATG ACGACGATAAGGACTATAA GGACGATGATGACAAGGA CTACAAAGATGATGACGAT AAATAAT	ATTATTATCGTCATCATCT TTGTAGTCCTTGTATCAT CGTCCTTATAGTCCTTATC GTCGTCATCCTTGTAAATCC	Annealing	XhoI-SwaI

Table S1: Oligonucleotides used to clone PTM and bifunctional RNA (1/2).

Structure	5'PTM 5'ss	3'PTM 3'ss	Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pUC19 + polylinker	
					PCR / Annealing	Sites
<b>5' PTM intron</b>						
Spacer			TCGAGTATCACCGATAATGT GTCTAACCTGATTCGGGCC TTCGATACGCTAAGATCCA CCGCGTCAACAAGTTTAA TTT	AAATAAACTGTTTGACG CGGTGGATCTTAGCGTATC GAAGGCCCGAATCAGGTT AGACACATATCGGTGATAC	Annealing	XhoI-SmaI
<b>3' PTM Intron</b>						
Spacer - Branch Point			TAATTCGAGCAGTTATAT AATGTTCTGACTCGC	GGCCGCGAGTCAGAACAT TATATAACGTGCTCGAATT AAT	Annealing	PacI-NotI
PPT			GGCCGCTCTTCTTTTTTTT TTA	CCGGTAAAAAAAAGAA GAGC	Annealing	NotI-AgeI
<b>Exon 3</b>	CAA/GTAAGT	GCAG/TG	CGTCCGGAGCAGTGGGT TAACGGAGTACACGTAGC TGAAATGAGGGGGTCA	AGCCTCGAGACTTACTTCG AGGCATCGGTTTATACAC TATGTACTCGGCGCAGA	PCR	AgeI-XhoI
Structure			Upper oligo	Lower oligo	Cloning	
					PCR / Annealing	Sites - Plasmid
<b>5' Trans-splicing C+</b>			GGCTTCGAGCAGCAGTGG T	ATGTTACAGTACGTGTA CCGTTA	PCR	SmaI - pCI-Neo
<b>3' Trans-splicing C+</b>			GGTACAATAGTGATAAAA CCGAT	CTCACCTCCAACGAGTAC AG	PCR	SmaI - pCI-Neo
<b>pCAG-GusB-Flag</b>			CGCGTATGGATTACAAGGA TGACGACGATAAGGACTAT AAGGACGATATGACAAG GACTACAAAGATGATGAC GATAAATGG	GGCCCAATTTATCGTCATC ATCTTTGAGTCTTGTGCA TCATCGTCTTATAGTCCTT ATCGTCGTATCCTTGTA TCCATA	Annealing	MluI - NotI - pCAG - GusB
Bifunctional RNA			Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pLV-THM	
					PCR / Annealing	Sites
<b>BD</b>			CGCGTCCCCTGTTACAGCT ACGTGTTTTTGGAAACCCG GGTT	CGAACCCGGGTTCAAAA AACACGTAGCTGAACATG GGGA	Annealing	MluI-Clal
<b>SF2/ASF tail</b>			CGCGTCCCAGGAGGACGG AGGACGGAGGACGGAGG ACGGAGGACTTTTTGGAA CCCGGGT	CGAACCCGGGTTCAAAA AGTCCTCCGCTCCGTCC TCCGTCTCCGTCTCCGG GGA	Annealing	MluI-Clal
<b>SC35 tail</b>			CGCGTCCCAGGAGGACGG GCCCCTGGGCCCTGGGC CCCTGGGCCCTGTTTTT GAACCCGGGT	CGAACCCGGGTTCAAAA ACAGGGGCCAGGGGCC AGGGGCCAGGGGCCAG GGGCCGGGA	Annealing	MluI-Clal
<b>5' SF2/ASF</b>			CGCGTATGTTACGCTACGT GTGGAGGACGGAGGACG GAGGACGGAGGACGGAG GACTTTTTGGAAACCCGG TT	CGAACCCGGGTTCAAAA AGTCCTCCGCTCCGTCC TCCGTCTCCGTCTCCAC ACGTAGCTGAACATA	Annealing	MluI-Clal
<b>3' SF2/ASF</b>			CGCGTGGAGGACGGAGGA CGGAGGACGGAGGACGG AGGACATGTTACGCTACGT GTTTTTGGAAACCCGGTT	CGAACCCGGGTTCAAAA AACACGTAGCTGAACATG TCTCCGTCTCCGTCTC CGTCTCCGTCTCCA	Annealing	MluI-Clal
<b>5' SC35</b>			CGCGTATGTTACGCTACGT GTGGGCCCTGGGCCCTG GGCCCCTGGGCCCTGGG CCCTGTTTTTGGAAACCCG GGTT	CGAACCCGGGTTCAAAA ACAGGGGCCAGGGGCC AGGGGCCAGGGGCCAG GGGCCACACGTAGCTGAA CATA	Annealing	MluI-Clal
<b>3' SC35</b>			CGCGTGGGCCCTGGGCC CTGGGCCCTGGGCCCTG GGGCCCTGATGTTACAGCT ACGTGTTTTTGGAAACCCG GGTT	CGAACCCGGGTTCAAAA AACACGTAGCTGAACATC AGGGGCCAGGGGCCAG GGGCCAGGGGCCAGGG GCCA	Annealing	MluI-Clal

Table S1: Oligonucleotides used to clone PTM and bifunctional RNA (2/2).

BD name and PTM affiliation	Length (bp)	cGusB Position <sup>a</sup>	Hybridization on GusB exon 3 5'ss	Hybridization on GusB exon 3 5'ss	Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pUC19+polylinker	
							PCR / Annealing	Sites
<b><i>5'PTM</i></b>								
BD1	101	2557-2657	+		GGGCCTCACTTCTGCTAA GGCCACCC	CAGACGCTTCCAAGTGA GCAGCACTC	PCR	Swal
BD2	131	2587-2717	-		GGGGCCTTGCTCTGTCTC TCAGCCTC	CCCCTGCCCCCCTGCCC CCCACCC	PCR	
BD3	25	2560-2584	+		AAATCAGAGTGCTGCTC ACTTGGAAAGCGTGGCCG G	CCACGCTTCCAAGTGAG CAGCACTCTGATTT	Annealing	Swal - FseI
BD4	50	2560-2609	+		ATTGTGGGGGGCAGGG GGGGCAGGGGAGCAGAG TGCTGCTCACTTGGAAAGC GTGGCCGG	CCACGCTTCCAAGTGAG CAGCACTCTGCTCCCTG CCCCCCTGCCCCCACA AAT	Annealing	
BD5	75	2560-2634	+		ATTTCGGCCCTAGTCCG AAGCCAGTGGGTGGGG GGCAGGGGGGGCAGGGG AGCAGAGTGCTGCTCAC TTGGAAGCGTGGCCGG	CCACGCTTCCAAGTGAG CAGCACTCTGCTCCCTG CCCCCCTGCCCCCACC CACTGGGCTTCCGACTAG GGGCCGAAAT	Annealing	
BD6	25	2699-2723	-		ATTTCAGCTGGGGCCTT GCTCTGTCTTGGCCGG	CCAAGGACAGAGCAAGG CCCCAGCTGGAAT	Annealing	
BD7	50	2674-2723	-		ATTTCAGCTGGGGCCTT GCTCTGTCTTCAGCCTC AGCTCACATGTCTCCCTG GGCCGG	CCCAGGGAGACATGTGA GCTGAGGCTGAAGGACA GAGCAAGGCCCCAGCTG GAAAT	Annealing	
BD8	75	2649-2723	-		ATTTCAGCTGGGGCCTT GCTCTGTCTTCAGCCTC AGCTCACATGTCTCCCTG ACCTCCAGAGCCAGGG CCTCACTTGGCCGG	CCAAGTGAGGCCCTGGC TCTGGGAGGTCAGGGAG ACATGTGAGCTGAGGCT GAAGGACAGAGCAAGGC CCCAGCTGGAAT	Annealing	
BD9	25	2644-2668	-		ATTTCAGAGCCAGGGC CTCACTTCTGCTGGCCGG	CCAGCAGAAGTGAGGCC CTGGCTTGGAAAT	Annealing	
BD10	50	2632-2681	-		ATTTCTCCCTGACCTCC CAGAGCCAGGCCTCAC TTCTGCTAAGGCCACCGG GGCCGG	CCCCGGTGGCCTTAGCA GAAGTGAGGCCTGGCT CTGGGAGGTCAGGGAGA AAAT	Annealing	
BD11	75	2620-2694	-		ATTTCAGCTCACATGT CTCCCTGACCTCCAGAG CCAGGGCCTCACTTCTGC TAAGGCCACCCGGCCCT AGTCGGAGGCCGG	CCTCCGACTAGGGCCG GGTGGCCTTAGCAGAAG TGAGGCCTGGCTCTGG GAGGTCAGGAGACATG TGAGCTGAGAAAT	Annealing	

Table S2: The binding domains: length, targeting information and oligonucleotides used to clone them in PTM (1/2).

BD name and PTM affiliation	Length (bp)	cGusB Position	Hybridization on GusB exon 3 5'ss	Hybridization on GusB exon 3 5'ss	Upper oligo	Lower oligo	Cloning in pUC19+polylinker	
							PCR / Annealing	Sites
<b><i>3'PTM</i></b>								
BD1	180	2208-2387		+	GCGCCTAGGCATGGACCC CAITCACCCACTGCAG	GCGTTAATTAAGTGGCCT GGTTTGGGAGCCAGTGG	PCR	
BD2	200	2118-2318		-	GCGCCTAGGGATGGACG CTACGTGGGGGCGGGG	GCGTTAATTAAGTGGCCT GGGGTGTCTGGTTCACA G	PCR	
BD3	25	2098-2122		-	AAATCAGAGTGTCTGCTC ACTTGGAAAGCGTGGCCG G	TAAGGCAGGGCAGGTGG TCGGGGCTGCTC	Annealing	
BD4	50	2098-2147		-	CTAGGGACCCCTGTGAA CCAGACACCCGAAGCA GCCCCGACCACCTGCCCT GCCTTAAT	TAAGGCAGGGCAGGTGG TCGGGGCTGCTTCGGGG TGTCTGGTTCACAGGGGT CC	Annealing	
BD5	75	2098-2172		-	CGTCTAGGCACCCGACG GAGCAGGCTTGT		PCR	
BD6	100	2098-2197		-	CGTCTAGGGTGGGGCCT GAGCATGGCCC	AGCTTAATTAAGGCAGGG CAGGTGGTGGGG	PCR	
BD7	150	2098-2247		-	CGTCTAGGGGAGAAT AAATCAGGCCAC		PCR	
BD8	25	2373-2397		+	CTAGGCATTCACCCACTG CAGACACAAGGATTAAT	TAATCCTTGTGTCTGCAG TGGGTGAATGC	Annealing	
BD9	50	2348-2397		+	CTAGGCATTCACCCACTG CAGACACAAGGAGACAT GGGGAGGTACGGCAAG TCATTAAT	TAATGACTTGCCTACCC TCCCCATGTCTCCTTGTG TCTGCAGTGGGTGAATGC	Annealing	AvrII - PacI
BD10	75	2323-2397		+		AGCTTAATTAATAAGGGT GCCTAAGGTGGCT	PCR	
BD11	100	2298-2397		+	CGTCTAGGCATTCACCC ACTGCAGACAC	AGCTTAATTAACGCCCC ACGTAGCGTCCAT	PCR	
BD12	150	2248-2397		+		AGCTTAATTAAGCGCTC ACTTCCCCATCC	PCR	
BD13	25	2219-2243		-	CTAGGGAATAAATCAGGC CACTGGCTCCCAITTAAT	TAATGGGAGCCAGTGGC CTGATTATTC	Annealing	
BD14	50	2207-2256		-	CTAGGGTGGAGCGCTGGG AGAATAAATCAGGCCACT GGTCCCAACCCAGGCC ACTTTAAT	TAAAGTGGCCTGGTTTGG GAGCCAGTGGCCTGATT ATTCTCCACGCGCTCACC	Annealing	
BD15	75	2194-2268		-	CGTCTAGGGGATGGG GGAAGTAGCGC	AGCTTAATTAACCACT GGGGTTAGTGGCC	PCR	
BD16	100	2182-2281		-	CGTCTAGGGCCGCTGG CTCAGGATGG	AGCTTAATTAACATGCTC AGGCCCCACACTG	PCR	
BD17	150	2157-2306		-	CGTCTAGGGTGGGGGC GGGGAGTCTGC	AGCTTAATTAAGCCTGCT CCTGCGGTGGATG	PCR	
<b><i>dPTM (5' PTM intron)</i></b>								
BD1	101	2557-2657		+	GGGCTCACTTCTGTCTAA GGCCACCC	CAGACGCTTCCAAGTGA GCAGCACTC	PCR	Swal
BD2	131	2587-2717		-	GGGGCCTTGTCTGTCTCT TCAGCCTC	CCCCTGCCCCCTGCCC CCCACCC	PCR	
<b><i>dPTM (3' PTM Intron)</i></b>								
BD1	180	2208-2387		+	GCGCCTAGGCATGGACCC CAITCACCCACTGCAG	GCGTTAATTAAGTGGCCT GGTTTGGGAGCCAGTGG	PCR	Swal - FseI
BD2	200	2118-2318		-	GCGCCTAGGGATGGACG CTACGTGGGGGCGGGG	GCGTTAATTAAGTGGCCT GGGGTGTCTGGTTCACA G	PCR	

Table S2: The binding domains: length, targeting information and oligonucleotides used to clone them in PTM (2/2).

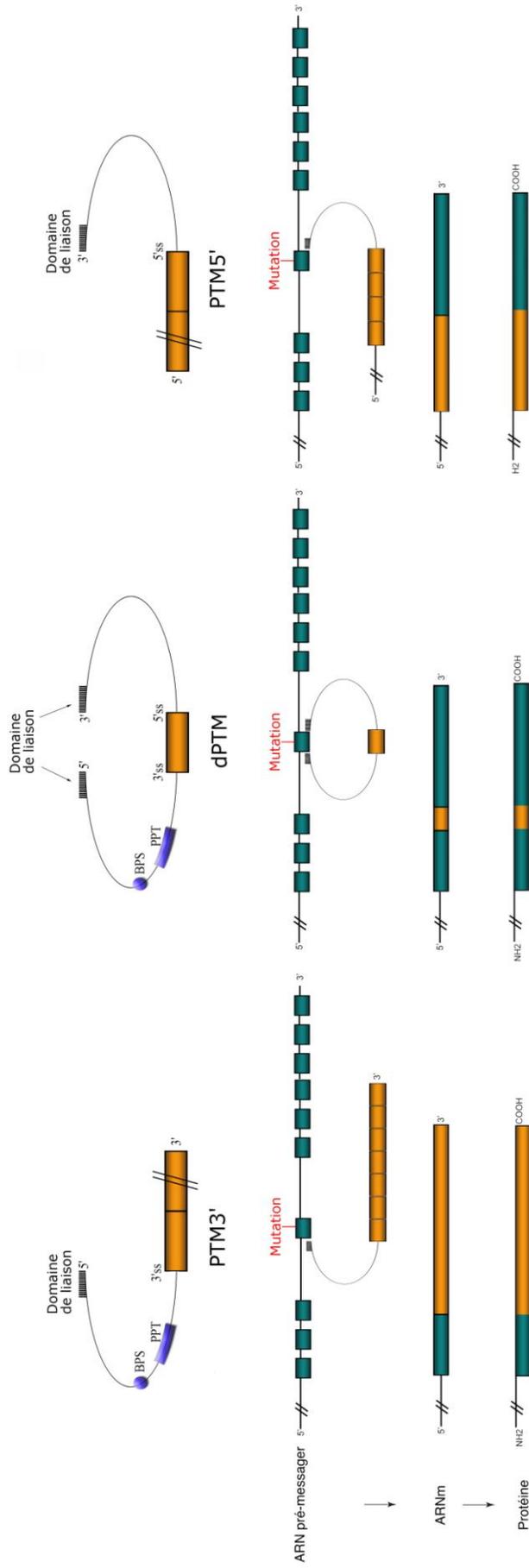


***DISCUSSION***

Dans cette étude, nous avons évalué la faisabilité du *trans*-épissage dans le modèle canin de la mucopolysaccharidose de type VII. Le *trans*-épissage, utilisant des PTM comme source de reprogrammation d'ARN pré-messagers défectueux, est décrit dans la littérature comme une possibilité d'utilisation des mécanismes d'épissage à une fin thérapeutique. Il a ainsi été montré possible de reprogrammer *in vivo* chez le rongeur des ARN pré-messagers impliqués dans la mucoviscidose (Liu et al., 2002), l'amyotrophie spinale (Coady et al., 2008), l'hémophilie (Chao et al., 2003), et une forme d'immunodéficience congénitale, l'immunodéficience liée au CD40 Ligand (Tahara et al., 2004).

Ces études ne s'intéressant à la reprogrammation de transcrits défectueux qu'à l'aide des PTM 5' et des PTM 3', nous avons souhaité nous intéresser au pouvoir de reprogrammation de trois types de PTM : les PTM 5', les PTM 3' et les double PTM (dPTM) (**Figure 20**). Les PTM 5' et 3' ont préalablement fait l'objet d'études et ont déjà été montrés capables d'une telle réaction (Mansfield et al., 2003; Puttaraju et al., 1999). Les PTM 5' ont été montrés capables de réagir *in vitro* (Mansfield et al., 2003), et les PTM 3' ont été montrés fonctionnels *in vitro* et *in vivo* (Chao et al., 2003; Chen et al., 2008a; Coady et al., 2008; Coady et al., 2007; Liu et al., 2002; Liu et al., 2005b; Mansfield et al., 2000; Puttaraju et al., 2001; Puttaraju et al., 1999; Rodriguez-Martin et al., 2005; Tahara et al., 2004; Zayed et al., 2007). Concernant le dPTM, même s'il est possible de lire quelques lignes le décrivant au fil des revues (Garcia-Blanco, 2003; Mansfield et al., 2004; Mitchell and McGarrity, 2005), aucune preuve formelle de sa capacité à effectuer une réaction de *trans*-épissage n'a, à ce jour, été décrite.

La littérature nous renseignant sur l'importance du choix du domaine de liaison quant à l'efficacité de réaction dont le PTM sera porteur (Mansfield et al., 2003; Puttaraju et al., 2001), nous avons souhaité tester, de façon systématique, un grand nombre de domaines de liaison, de longueurs croissantes et de répartition homogène le long de l'intron à cibler. 11 domaines de liaison ont été testés pour les PTM 5', 17 pour les PTM 3' et 2 pour les dPTM.



**Figure 20: Les réactions de trans-épissage et l'architecture des PTM**

Les PTM5' sont constitués d'une partie exonique comprenant l'exon à remplacer et tous les exons situés en son amont, d'un site 5'ss et d'un domaine de liaison conférant sa spécificité d'action à la molécule. Les PTM3' sont constitués d'une partie exonique comprenant l'exon à remplacer et des exons situés en son aval, d'un site 3'ss, d'une séquence intronique comprenant le BPS et le PPT, et d'un domaine de liaison spécifique de la séquence à cibler. Les doubles PTM (dPTM) quant à eux sont composés des séquences introniques des PTM5' et des PTM3', et d'une séquence codante constituée uniquement de l'exon à reprogrammer.

Tous les PTM ont été testés dans deux environnements différents : l'environnement minigène et l'environnement endogène. Dans l'environnement minigène, le PTM se trouve en présence de cibles transcrites à partir d'un plasmide, présent en grand nombre dans la cellule. Dans l'environnement endogène, le PTM doit reprogrammer des transcrits produits à partir des gènes cellulaires naturels (2 copies par cellules).

Enfin, pour augmenter l'efficacité de la réaction de *trans*-épissage, nous avons testé l'effet de 2 molécules : i) le snRNA U7 dont le rôle dans notre étude est de concentrer les PTM dans le noyau et plus particulièrement dans les sites d'épissage *via* le recrutement de protéines spliceosomales et ii) les ARN bifonctionnels dont le rôle consiste à faciliter la reconnaissance et la prise en charge du PTM par le spliceosome *via* le recrutement d'activateurs de l'épissage.

## **1 Profils de *trans*-épissage obtenus dans l'environnement minigène**

### **1.1 Au niveau moléculaire**

Dans cette étude, nous avons montré la faisabilité du *trans*-épissage dans un modèle canin de la MPS VII, modèle complexe de maladie puisque causée par la perte de fonction d'une protéine homotétramérique. Dans l'environnement minigène, la plupart des PTM 5', 3' et doubles sont capables de réagir avec la cible. Nos résultats de RT-PCR le montrent sans ambiguïté.

Concernant les PTM 5', seuls les PTM 5' BD3 et BD9 n'ont pas pu être montrés fonctionnels pour le *trans*-épissage. Cependant, parmi tous les PTM compatibles avec une telle réaction, un grand nombre d'entre eux réagit de façon indésirable. Des analyses par séquençage des bandes amplifiées par RT-PCR montrent la présence d'inclusions introniques

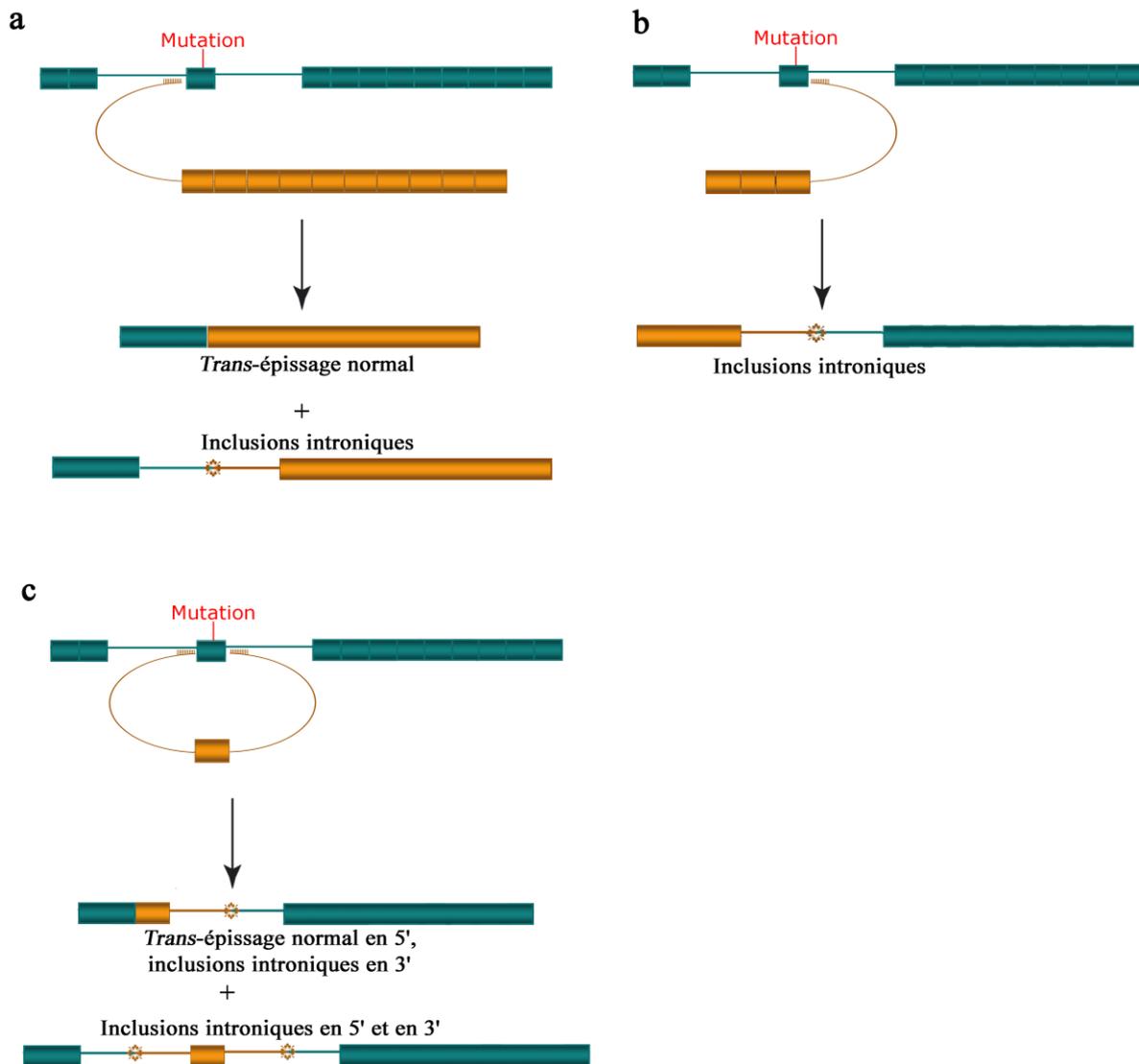
dans la molécule *trans*-épissée (**Figure 21b**). La structure de l'ARN messager obtenu n'est pas compatible avec une activité protéique  $\beta$ -glucuronidase normale, puisque ces inclusions introniques contiennent non seulement des séquences exogènes surnuméraires, mais aussi des codons stop prématurés. De façon intéressante, nous avons remarqué une variation de la taille des inclusions introniques en fonction du domaine de liaison utilisé. En effet, la réaction de *trans*-épissage non désirée a lieu à l'endroit où les domaines de liaison ne s'hybrident plus avec la cible, comme montré par séquençage. Il est d'ailleurs important de noter que nous avons vérifié que ces formes ne témoignaient pas d'évènements de recombinaison entre le plasmide porteur du PTM et le plasmide porteur du minigène, mais bien d'évènements de *trans*-épissage. Plus précisément, nous pensons que ces réactions non désirées sont dues à des activations de sites cryptiques d'épissage. Dans leur étude utilisant un minigène  $\beta$ -galactosidase, Mansfield et al quant à eux n'ont fait part d'aucun événement de *trans*-épissage non désiré (Mansfield et al., 2003). Il semble donc que les PTM 5' agissent correctement ou incorrectement en fonction du contexte d'étude.

Dans le cas des PTM 3', tous nos PTM ont été capables de réagir correctement avec la cible exprimée à partir du minigène. Cependant, 2/3 d'entre eux ont aussi réagi de façon anormale. Ici aussi, des analyses par séquençage ont montré que ces réactions non désirées correspondaient bien à une réaction entre le PTM et sa cible, mais que la molécule d'ARN résultante contenait une inclusion intronique dans la séquence codante des ARN *trans*-épissés matures (**Figure 21a**). À l'instar des analyses effectuées pour les PTM 5', nous avons cherché à savoir si ces bandes surnuméraires n'étaient pas le résultat de réactions de recombinaisons entre le plasmide porteur du PTM et le plasmide porteur du minigène. Nous n'avons été en mesure de détecter aucun événement de recombinaison, démontrant que la présence des bandes non désirées résultait bien d'une réaction de *trans*-épissage. Malgré tout, les PTM 3' BD2 à BD7 sont aptes à réagir de façon totalement spécifique, permettant la reprogrammation du messager  $\beta$ -glucuronidase à la base près. Dans la littérature, il a déjà été montré que les PTM 3' peuvent agir de façons « spécifique + non-spécifique », c'est-à-dire de façon partiellement correcte, mais aussi partiellement incorrecte (Mansfield et al., 2000). Dans cette étude, Mansfield et al, quant à eux, ne testent pas plusieurs domaines de liaison pour remédier au problème, mais plusieurs minigènes. Cette étude montre ainsi qu'il est possible d'éliminer

les évènements de *trans*-épissage non désirés en changeant de minigène. Nos résultats, additionnés aux résultats précédents (Mansfield et al., 2000), suggèrent que les évènements de *trans*-épissage anormaux observés à l'aide des PTM 3' sont le fruit d'un dysfonctionnement du PTM ou de sa cible, et que travailler sur la structure de l'un ou l'autre des éléments permet de s'affranchir de ces réactions.

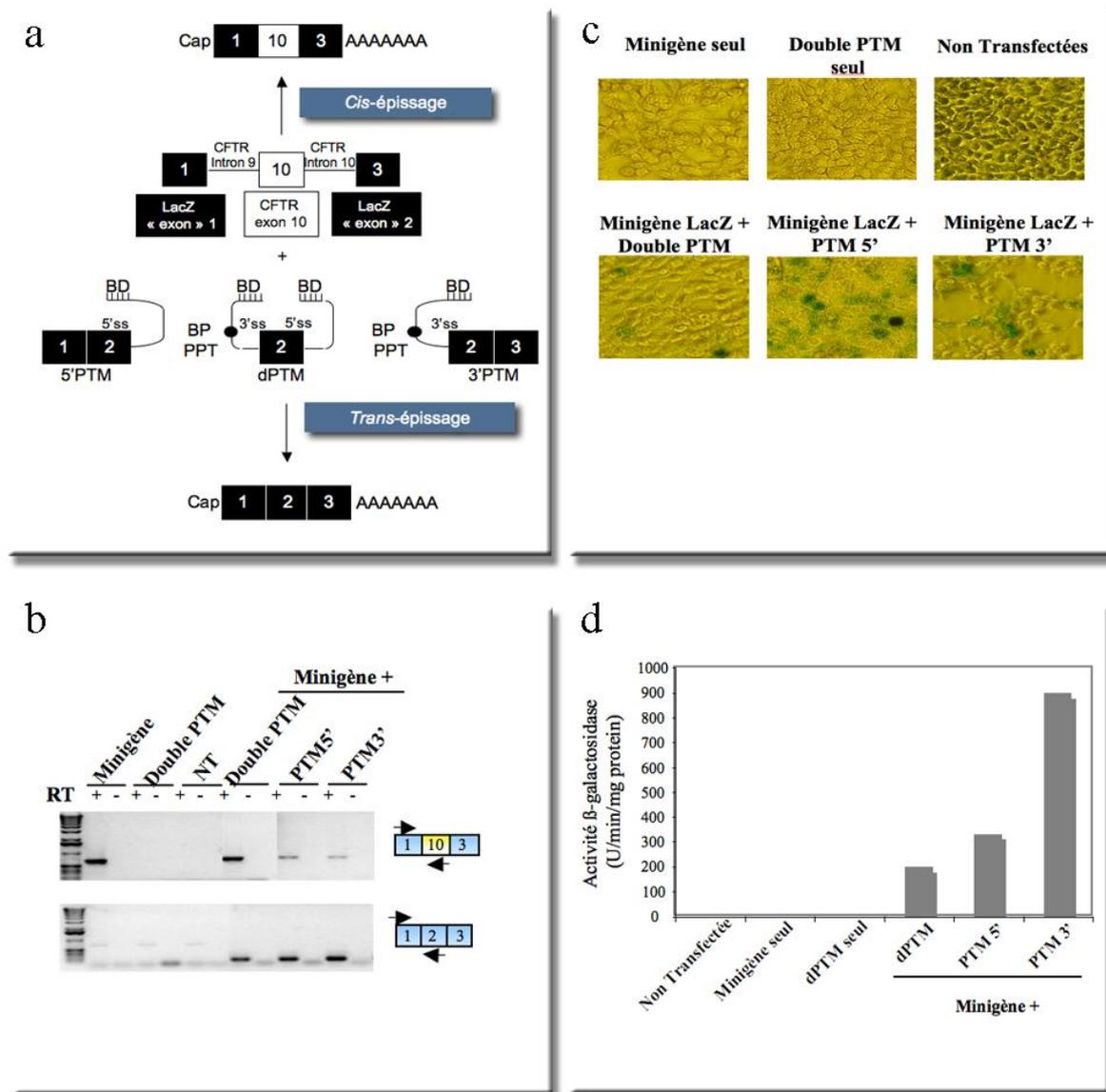
Enfin, nous avons montré que les dPTM réagissent exactement comme les PTM 5' et 3' correspondants. Plus clairement, le dPTM BD1 réagit exactement comme le PTM 3'BD1 et comme le PTM 5'BD1, alors que le dPTM BD2 réagit exactement comme le PTM 3'BD2 et comme le PTM 5'BD2. Ici aussi, des inclusions introniques ont été caractérisées par séquençage (**Figure 21c**), résultant d'une réaction de *trans*-épissage anormale, non pas d'une réaction de recombinaison homologue. Dans l'environnement minigène, aucun des deux dPTM testés n'a donc été capable de corriger correctement le pré-messager ciblé. Cependant, nous avons testé les dPTM dans un deuxième environnement. Pour cela, nous avons utilisé un minigène Lac Z, ainsi qu'un PTM 5' et un PTM 3' ayant déjà été montrés fonctionnels pour le *trans*-épissage (Mansfield et al., 2003; Puttaraju et al., 2001). Le minigène Lac Z est composé des parties 5' et 3' de la séquence codant la  $\beta$ -galactosidase, entre lesquelles ont été clonés l'exon 10 et les mini-intron 9 et 10 du gène *cftr*. Ce minigène, lorsqu'il se *cis*-épisse, code une  $\beta$ -galactosidase non fonctionnelle. Lorsqu'il est co-transfecté avec le PTM 5' ou le PTM 3', l'activité  $\beta$ -galactosidase réapparaît (**Figure 22**). Nous avons créé un dPTM à partir des PTM 5' et 3', et l'avons testé en cellules 293 en le co-transfectant avec le minigène Lac Z. Les résultats dans cet environnement montrent que les dPTM sont capables de réagir de façon correcte avec la cible, comme observé par RT-PCR, par coloration au X-gal et par mesure de l'activité enzymatique  $\beta$ -galactosidase des cellules ainsi co-transfectées (**Figure 22**). Ainsi, il semble que les dPTM agissent eux aussi correctement ou incorrectement en fonction du contexte d'étude, mais qu'ils peuvent clairement permettre la réparation d'un messager défectueux.

Finalement, il se dégage de ces expériences dans le système minigène que les PTM 3' BD2 à BD7 sont capables de réagir de façon correcte. Nous avons alors souhaité savoir si la présence d'ARNm *trans*-épissés résultait en l'apparition d'une protéine fonctionnelle.



**Figure 21 : Profils de trans-épissage obtenus dans l'environnement minigène *GusB* canin**

**a** : Les PTM 3' réagissent avec le transcrite exprimé à partir du minigène, en produisant un transcrite correctement *trans*-épissé, mais aussi un transcrite dans lequel des inclusions introniques sont présentes, composées de séquences introniques provenant du minigène et du PTM. **b** : Dans le cas des PTM 5', les molécules *trans*-épissées sont toujours porteuses d'inclusions introniques, ici aussi composées de séquences issues du minigène et du PTM. **c** : Dans le cas des dPTM, la réaction sur le 3'ss de la cible (réaction de type « PTM 3' ») peut être correcte ou incorrecte, alors sur le 5'ss de la cible (réaction de type « PTM 5' »), la réaction est toujours anormale.



**Figure 22 : Profils de trans-épissage obtenus dans l'environnement minigène Lac Z**

**a** : dans ce modèle d'étude, un minigène Lac Z a été créé, composé de la partie 5' et de la partie 3' du gène codant la  $\beta$ -galactosidase, entre lesquelles la séquence 'intron 9 - exon 10 - intron 10' du gène *cftr* a été insérée. Une réaction de *cis*-épissage de ce minigène conduit à la production d'un transcrite codant une protéine  $\beta$ -galactosidase non fonctionnelle. Des PTM 5', 3' et double ont été créés, capables de se *trans*-épisser avec la cible et de rétablir une activité  $\beta$ -galactosidase. **b, c et d** : des cellules 293 ont été cotransfectées par le minigène Lac Z et les différents types de PTM. Une RT-PCR montre que le dPTM, comme les PTM 5' et 3', est capable de reprogrammer le transcrite exprimé à partir du minigène (**b**); une coloration au X-gal des cellules cotransfectées montre que l'ARN *trans*-épissé conduit à la production d'une protéine fonctionnelle (**c**), résultat confirmé par une mesure d'activité enzymatique, qui de plus montre que le dPTM est malgré tout moins efficace que les PTM 5' et 3'.

## 1.2 Au niveau protéique

Au niveau protéique, nous n'avons jamais été en mesure de détecter la protéine issue de la réaction de *trans*-épissage à l'aide des PTM 5' et des dPTM, ce qui s'explique par la présence des inclusions introniques, décalant le cadre ouvert de lecture et insérant des codons stop prématurés dans la séquence codante du transcrit *trans*-épissé. Concernant les PTM 3' BD2 à BD7, nous avons été en mesure de détecter la protéine issue de la réaction de *trans*-épissage, et de la caractériser comme fonctionnelle par mesure d'activité  $\beta$ -glucuronidase et par coloration chimique. Cependant, l'activité enzymatique est relativement faible. Deux facteurs permettent d'expliquer ces résultats, et sont détaillés ci-dessous.

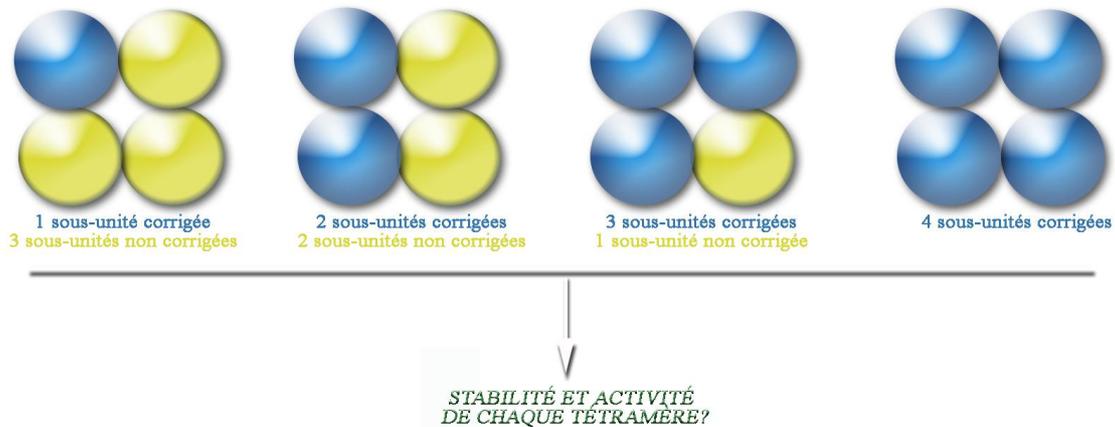
### 1.2.1 Présence du Tag 3xFlag

Le Tag 3xFlag ajouté en 5' des PTM 5' et en 3' des PTM 3' pourrait être une cause de la faible activité  $\beta$ -glucuronidase mesurée dans les essais de cotransfection des PTM 3' BD2 à BD7 et du minigène. En effet, sa présence pourrait gêner la structure tertiaire de la protéine et résulter en une baisse de l'activité enzymatique. À titre indicatif, nous avons cherché à évaluer l'impact de la présence de ce tag. Il apparaît que, présent en N-terminal de la protéine, il réduit l'activité enzymatique d'un facteur 3 (résultats non présentés). Malgré tout, nous avons choisi de travailler avec cet épitope car il nous permettait de détecter les protéines issues des réactions de *trans*-épissage par Western blot.

### 1.2.2 Homotétramérisation de la $\beta$ -glucuronidase

Le caractère homotétramérique de la protéine  $\beta$ -glucuronidase, lui aussi, ne joue pas en la faveur d'une forte activité enzymatique à l'issue des tentatives de *trans*-épissage. Plus précisément, la protéine mutée ayant été caractérisée instable mais partiellement fonctionnelle (Ray et al., 1999), la question du réarrangement au sein de l'homotétramère se pose. Il est possible qu'une ou plusieurs sous-unité(s) « corrigée(s) » s'associent avec une ou plusieurs sous-unité(s) « mutée(s) » (**Figure 23**). La stabilité et l'activité enzymatique résultante de ces arrangements n'a pas été étudiée dans notre cas, mais théoriquement, de telles

multimérisations ne seraient pas en la faveur de la formation d'un complexe stable et donc responsable d'une forte activité enzymatique.



**Figure 23 :** Illustration des différentes possibilités d'arrangements des sous-unités reprogrammées et des sous-unités mutées.

En d'autres termes, travailler sur une protéine monomérique ou hétéromultimérisée nous aurait probablement permis d'obtenir une activité plus importante. Même si notre étude n'avait pas un but clinique, nous pouvons nous demander, par curiosité scientifique, l'impact qu'aurait eu cette donnée chez l'Homme. Chez l'Homme, 20% des mutations sont causées par une substitution d'une phénylalanine par une lysine en position 176 (Muenzer, 2004). Cette mutation, responsable d'un profil médian en termes de gravité phénotypique, ne provoque pas la rupture du cadre ouvert de lecture et l'absence de protéine  $\beta$ -glucuronidase. Le maintien partiel d'activité  $\beta$ -glucuronidase chez ces patients est le fruit du réarrangement de sous unités partiellement fonctionnelles. Par conséquent, les mêmes questions se seraient posées chez l'Homme. En fonction de la mutation, de la présence ou de l'absence totale de sous-unités mutées, l'effet du traitement aurait pu varier. Cependant, dans notre modèle, une efficacité accrue des PTM nous aurait permis de nous affranchir de cette question : comme le nombre de transcrit reprogrammés est directement inverse à celui des transcrit mutés, si la réaction de *trans*-épissage avait été très efficace, alors le nombre de protéines mutées aurait été faible, et la question des réarrangements aurait eu une moindre importance. Notons d'ailleurs que dans les stratégies substitutives, la production de  $\beta$ -glucuronidase canine transgénique n'empêche pas la production de protéine endogène. Les mêmes réarrangements ont donc lieu, mais n'empêchent pas l'amélioration phénotypique (Ponder et al., 2002). Dans ce cas, la quantité

de protéine normale étant supérieure à la quantité de protéine mutée, il est probable que les sous-unités transgéniques se réarrangent préférentiellement entre elles.

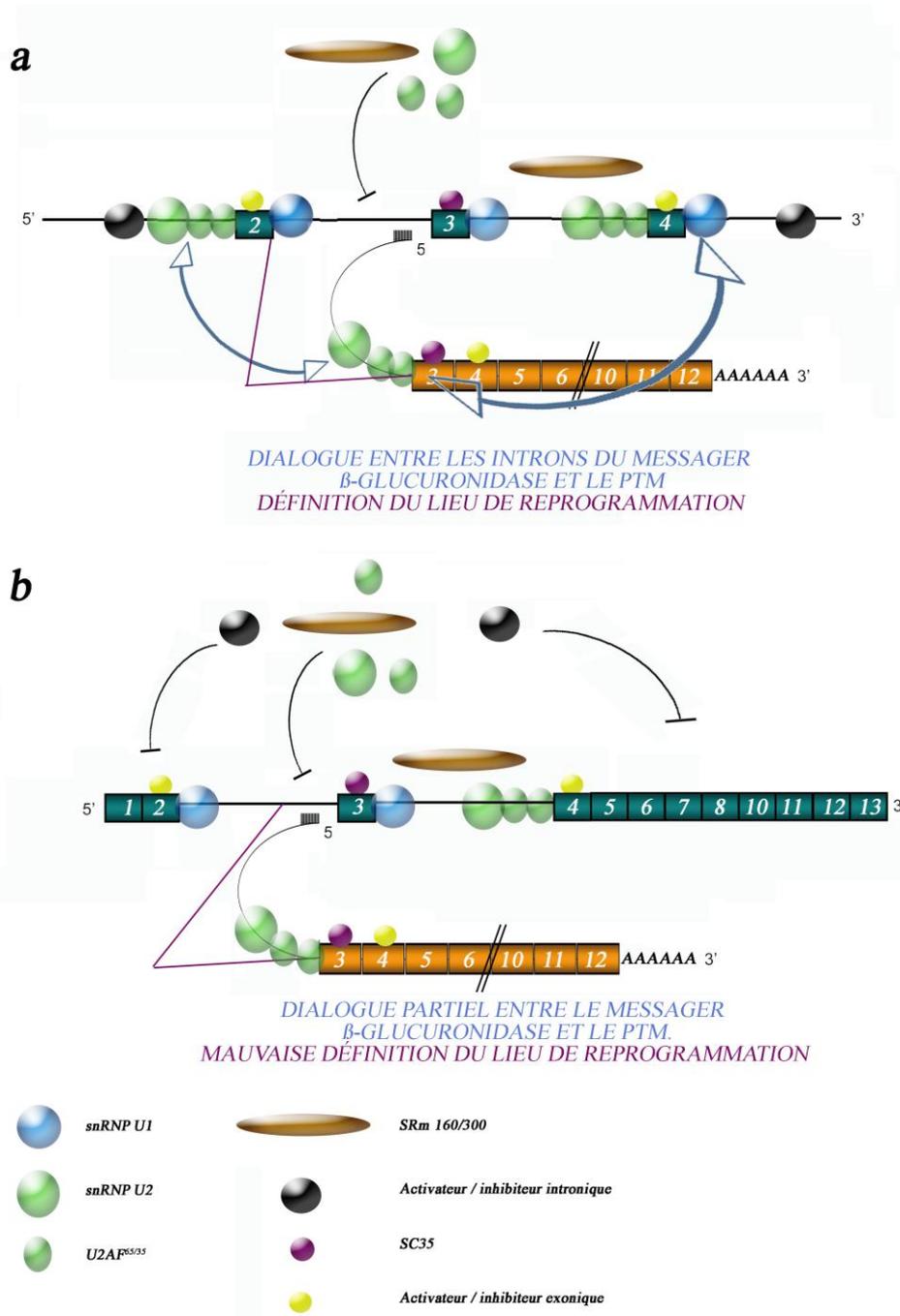
## 2 Profils de trans-épissage obtenus dans l'environnement endogène

Lors de notre passage du système minigène vers le système endogène, nous avons été confrontés à des difficultés. Premièrement, il est clair que la quantité de cible à reprogrammer est très inférieure dans un environnement génétique naturel. De plus, la composition intronique de la cible exprimée à partir des gènes endogènes est différente. Si le minigène ne contient que 2 introns, le gène endogène en contient 11. Nous avons noté deux changements lors de notre passage sur cible endogène : i) un changement de profil de *trans*-épissage, et ii) une difficulté de mise en évidence des événements de *trans*-épissage.

### 2.1 Différence d'action entre les environnements minigène et endogène

Une chose étonnante a été la différence de profils de *trans*-épissage obtenus entre les environnements minigène et endogène. Alors que le PTM 5' BD1 est incapable de réagir correctement dans l'environnement minigène, dans l'environnement endogène, la réaction est normale. Il en est de même pour un certain nombre de PTM 3'. Des événements similaires ont déjà été obtenus (Coady et al., 2007; Mansfield et al., 2000). Dans l'étude de Coady et al par exemple, une bande surnuméraire, de plus haut poids moléculaire, est présente quand le PTM est cotransfecté avec un minigène SMN2. Cette bande disparaît lors du passage à l'environnement endogène. Nous pensons que l'explication de tels résultats tient à la structure du minigène elle-même. Composé d'un cDNA dans lequel 2 introns ont été placés, il est presque certains que des acteurs de l'épissage de l'intron 3 de la  $\beta$ -glucuronidase sont manquants (des sites 5'ss, 3'ss, des sites activateurs ou inhibiteurs de l'épissage introniques en amont ou en aval de l'exon 3), et que leur présence dans l'ARN  $\beta$ -glucuronidase sauvage permette le bon déroulement de la réaction. En d'autres termes, il est possible que certains éléments introniques présents sur la cible agissent sur l'ensemble PTM-Spliceosome-Cible, et permette une bonne reconnaissance des signaux d'épissage, et ainsi le déroulement normal de

la réaction (**Figure 24**). Cependant, un certain nombre de PTM 3' agissent correctement dans l'environnement minigène. Dans leur cas, l'hybridation du domaine de liaison contrebalance certainement l'action manquante de ces éléments en empêchant par exemple l'utilisation de sites cryptiques d'épissage.



**Figure 24:** Explication des différences de profils de *trans*-épissages obtenus dans les systèmes minigène et endogène.

**a :** dans l'environnement endogène, tous les exons et tous les introns du transcrite sont définis par le spliceosome. Des dialogues existent entre les éléments définissant les exons et ceux définissant les introns. La réaction de *trans*-épissage fait probablement appel à tous ces partenaires pour définir le site d'épissage sur lequel le PTM sera branché. **b :** dans le système minigène, seuls les introns 2 et 3 et l'exon 3 sont définis. Il en résulte un dialogue pauvre entre le PTM et sa cible, l'activation probable d'un site cryptique d'épissage et donc un *trans*-épissage anormal.

À la vue de ces résultats, il devient donc périlleux pour les futurs expérimentateurs de cribler des PTM (pour leur efficacité et/ou leur spécificité) dans un système minigène, puis de passer sur cible endogène. En effet, rien ne garantit que les PTM agissant anormalement avec le transcrit exprimé à partir du minigène réagiront aussi anormalement avec une cible naturelle. Le risque est alors d'éliminer un PTM efficace sur cible endogène parce qu'il réagit anormalement sur cible minigène. Nous pensons qu'il est plus pertinent de cribler les PTM directement sur cible endogène, même si ce travail est rendu difficile par l'efficacité de *trans*-épissage elle-même.

## 2.2 Problème d'efficacité des PTM

Pour expliquer les difficultés auxquelles nous avons été confrontées dans l'environnement endogène, il faut tenir compte l'efficacité du PTM, elle-même critique et provoquant une difficulté de mise en évidence des événements de *trans*-épissage, au niveau moléculaire comme au niveau protéique. Concernant les problèmes de performance des PTM, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les faibles taux de reprogrammation que nous avons obtenus.

### 2.2.1 Problème de spécificité des PTM ?

Malgré le nombre de domaines de liaisons testés, il est possible que les PTM que nous avons créés réagissent de façon aspécifique, c'est-à-dire i) soit de façon incorrecte avec la cible  $\beta$ -glucuronidase, ii) soit avec une toute autre cible. Bien que cela ne soit pas étonnant, une étude a formellement démontré que le domaine de liaison du PTM n'est en aucun cas nécessaire à la réaction. Les sites d'épissage en sont responsables (Kikumori et al., 2001). Pire, les auteurs montrent par RT-PCR et par RACE PCR que i) sur cible minigène, des événements de *trans*-épissage ont lieu entre les exons en amont ou en aval de l'exon à reprogrammer, indépendamment de la présence d'un domaine de liaison, et que ii) sur cible

endogène, moins de 5% des évènements de *trans*-épissage sont spécifiques, la majorité des évènements impliquent les PTM et des cibles aléatoires. Les auteurs ont tenté d'augmenter la spécificité des PTM en utilisant une « safety stem » (cf. **Figure 15** de l'introduction, **p71**), et ont finalement montré que cette structure secondaire n'a pas d'effet dans leur cas. À partir de cette étude, nous pouvons conclure que le domaine de liaison, bien qu'il permette un meilleur adressage du PTM vers sa cible et qu'il augmente l'efficacité de la réaction, n'est pas en lui-même indispensable à la réaction. Cette observation a récemment été confirmée par une équipe travaillant sur des PTM sans domaines de liaisons pour identifier l'importance de la proximité géographique du PTM et de sa cible sur à l'efficacité de réaction (Viles and Sullenger, 2008). Cette étude montre, elle aussi, la possibilité donnée au PTM d'agir de façon aléatoire. La conséquence de ces observations est la suivante : même si le domaine de liaison est présent, il est possible que les sites d'épissages des PTM et les snRNP associées réagissent avec un ARN pré-messager quelconque de façon aspécifique, sans aucune intervention du domaine de liaison. Ces études ont donc mis en évidence la possibilité laissée au PTM d'interagir avec des transcrits quelconques. Cette réaction pourrait avoir des effets gravissimes pour la cellule si le transcrit touché code une protéine impliquée dans le cycle cellulaire ou la survie cellulaire par exemple.

Dans notre cas, il est donc possible que les PTM aient réagi avec d'autres cibles, de façon aléatoire et indépendamment de la nature des domaines de liaison. Les sites 5'ss sur les PTM 5' et doubles et les sites 3'ss sur les PTM 3' et doubles sont théoriquement aptes à réagir avec des cibles endogènes différentes de la  $\beta$ -glucuronidase, diminuant la quantité de PTM disponible pour la réaction souhaitée, et diminuant l'efficacité de *trans*-épissage entre le transcrit  $\beta$ -glucuronidase et les PTM. Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à mesurer l'aspécificité de nos constructions. Nous avons en effet choisi de tout d'abord essayer d'augmenter leur efficacité. Des expériences de RACE PCR permettraient ensuite d'évaluer l'impact du manque de spécificité sur l'efficacité de *trans*-épissage.

### 2.2.2 Compétition *cis* versus *trans*-épissage ?

L'hybridation du domaine de liaison sur la cible ne garantit pas le déroulement de la réaction de *trans*-épissage. Il est possible que le spliceosome choisisse malgré tout la voie du *cis*-épissage. Il a d'ailleurs été montré qu'il existe une compétition entre *cis*- et *trans*-épissage. En effet, des essais *in vitro*, lors desquels les expérimentateurs ont augmenté progressivement la quantité de PTM dans le mélange réactionnel ont montré que plus la quantité de PTM présents augmentait, plus la quantité de transcrits *cis*-épissés baissait (Puttaraju et al., 1999). Cependant, ce test, effectué *in vitro*, semble difficilement reproductible *in vivo*. Une autre possibilité pour empêcher le bon déroulement du *cis*-épissage à la faveur du *trans*-épissage est de bloquer les sites recruteurs du spliceosome à l'aide des domaines de liaisons. C'est pourquoi, à l'instar d'autres études (Liu et al., 2002; Liu et al., 2005b; Mansfield et al., 2003; Mansfield et al., 2000; Puttaraju et al., 2001; Zayed et al., 2007), nous avons choisi de tester quelques domaines de liaison ciblant des sites d'épissage présents sur le transcrit  $\beta$ -glucuronidase. Cependant, dans ces cas, il est possible que le spliceosome ne choisisse pas le *trans*-épissage comme voie annexe, mais qu'il préfère sauter l'exon en question. Dans notre cas, la présence du PTM et de son domaine de liaison pourrait ainsi favoriser le saut de l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase, ou la rétention des introns le bordant. Ces sauts d'exons ou rétentions d'introns étant facilement visualisable par RT-PCR, nous avons vérifié cette possibilité par et n'avons pas remarqué de différences entre le profil de *cis*-épissage du transcrit en présence et en absence des PTM (résultats non présentés). En conclusion, dans notre modèle, la compétition *cis*-épissage *versus* *trans*-épissage ne semble pas responsable du manque d'efficacité.

### 2.2.3 Absence d'ISE ou d'ESE dans les PTM ?

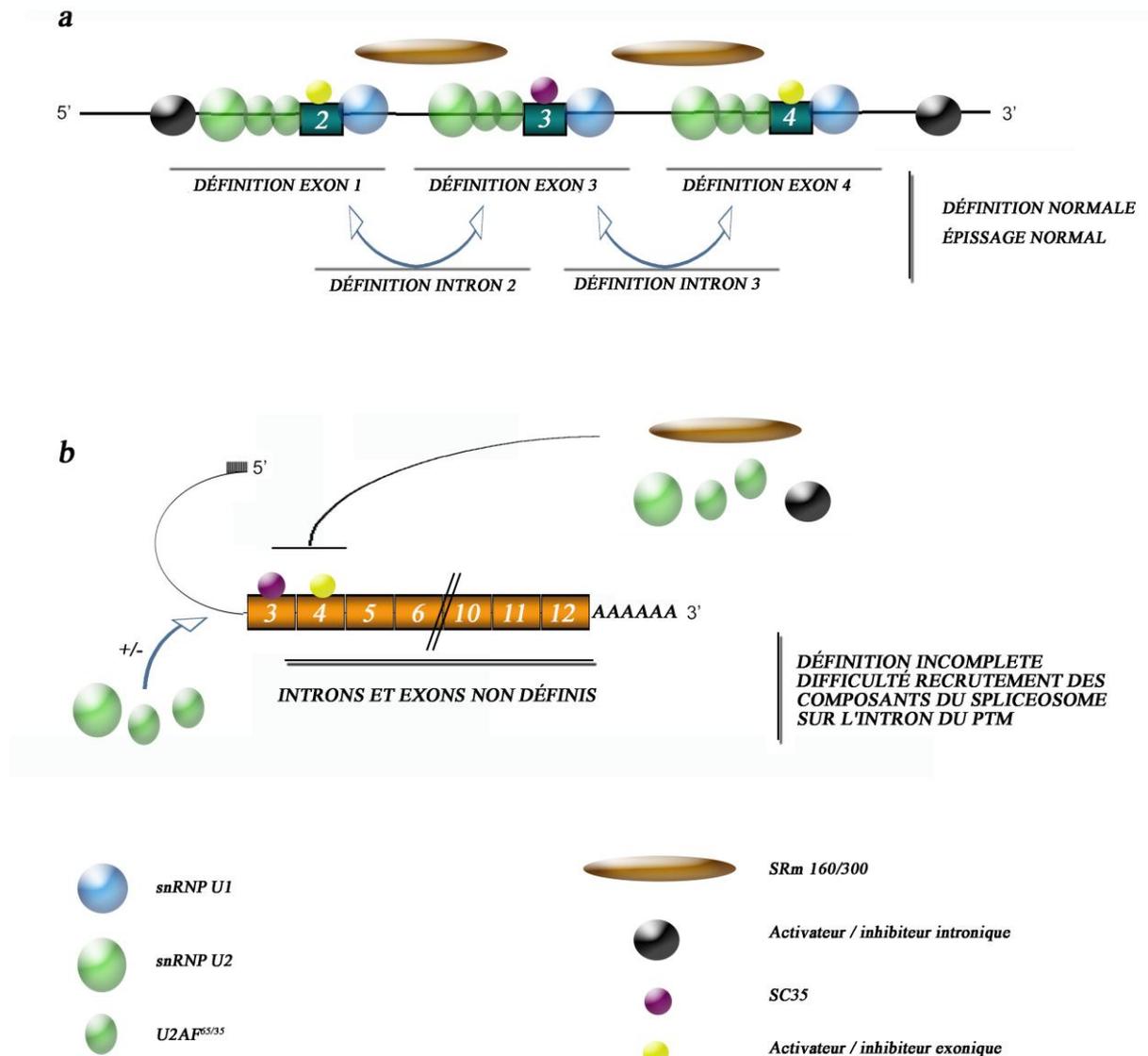
Dans les protocoles de *trans*-épissage, et contrairement aux stratégies d'inclusion et d'exclusion d'exon, le spliceosome doit intégrer une séquence exogène dans un ARN pré-

messager. Une des questions majeures que cela pose est celle de la définition d'exon du PTM. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les signaux consensuels d'épissage ne suffisent souvent pas, à eux seuls, à diriger le spliceosome vers l'épissage d'un exon particulier. Le spliceosome a besoin de signaux secondaires, apportés notamment par les activateurs et inhibiteurs introniques et exoniques de l'épissage (ISE et ESE, respectivement) et par les protéines modulatrices de l'épissage (protéines SR et hnRNP notamment) (**Figure 25a**). Le choix des signaux d'épissage étant un processus très finement régulé, demander au spliceosome d'intégrer une séquence dont les signaux d'épissage ne sont représentés que par les séquences consensuelles d'épissage est une chose délicate. Dans notre cas, il est probable que le spliceosome reconnaisse l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase par le biais de signaux multiples, introniques comme exoniques, faisant intervenir des protéines modulatrices de l'épissage. Dans une étude, les auteurs ont d'ailleurs réfléchi à ce problème et ont inséré un intron dans la séquence codante d'un PTM 5' (Mansfield et al., 2003). La présence de cet intron a permis une augmentation de l'efficacité de *trans*-épissage de 60 fois dans leur modèle, suggérant que la définition d'exon du PTM était une variable à prendre en compte.

Il est donc possible que, dans notre modèle, l'absence sur le PTM d'un activateur intronique de l'épissage présent sur les introns 2 et 3 empêche la bonne reconnaissance du PTM par le spliceosome, aboutissant à un manque d'efficacité de la réaction de *trans*-épissage (**Figure 25b**).

Nous avons aussi évalué la présence des activateurs exoniques de l'épissage nécessaires à la prise en charge de l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase sur le transcrit  $\beta$ -glucuronidase et sur les PTM 3', à l'aide du logiciel « ESE Finder 2.0 ». Nous avons retrouvé le même profil de recrutement de protéines SR entre l'exon 3 de la cible et celui du PTM. Plus précisément, un site fort de recrutement de la protéine SC35 est présent sur la cible et sur le PTM, montrant que la dégénérescence du PTM n'a pas endommagé ces signaux. Cependant, une vue exhaustive du profil de recrutement des modulateurs de l'épissage est difficile à obtenir, puisque i) tous les modulateurs de l'épissage ne sont pas connus, ii) les logiciels disponibles ne s'intéressent la plupart du temps qu'à un ou deux activateurs de l'épissage et iii) les études bioinformatiques ne représentent que des évaluations et ne font en

aucun cas figure de preuve. Des études expérimentales seraient donc nécessaires pour prouver que la dégénérescence des PTM n'a pas endommagé le recrutement d'activateurs d'épissage.



**Figure 25: Le problème de définition d'exon des PTM.**

**a** : dans le cas du *cis*-épissage, les exons et les introns sont interconnectés par une série d'interactions protéiques impliquant les composants spliceosomaux, les protéines modulatrices de l'épissage (SR/hnRNP) et les protéines « SR like » (U2AF, SRm). La définition des exons en amont ou en aval de l'exon 3 de la  $\beta$ -glucuronidase pourrait être importante à celle de l'exon 3 lui-même. **b** : exemple du PTM 3'. Dans le cas des PTM, la séquence cDNA portée par le PTM manque d'un grand nombre de sites introniques d'épissage, consensuels comme modulateurs. Il en résulte une moins bonne définition du PTM que de sa cible, une moins bonne prise en charge du PTM par le spliceosome et donc une réaction de *trans*-épissage inefficace.

#### 2.2.4 Présence d'un ESS dans la zone dégénérée ?

La dégénérescence que nous avons appliquée à tous les PTM pour faciliter la mise en évidence des évènements de *trans*-épissage pourrait elle aussi être la source du manque d'efficacité que nous avons observé. Modifier des paires de bases, quand bien même la séquence protéique en aval n'est pas modifiée, peut aboutir au blocage d'un site activateur de l'épissage ou au contraire à l'activation d'un site inhibiteur de l'épissage. Ici aussi, nous avons évalué la présence des activateurs de l'épissage dans ces zones et n'avons pas remarqué de défaut majeur de recrutement dans les zones dégénérées.

Cependant, en cherchant à connaître le profil de recrutement d'inhibiteurs de l'épissage, nous avons identifié un site de recrutement d'une protéine hnRNP, crée par la dégénérescence elle-même. Ce site a d'ailleurs été ciblé par le domaine de liaison des ARN bifonctionnels testés par la suite. Son blocage a permis d'augmenter l'efficacité de réaction. En conclusion, si la dégénérescence permet de faciliter la détection des évènements de *trans*-épissage, elle représente un outil à manier avec précaution. Des évaluations *in silico* du profil de recrutement des activateurs et des inhibiteurs de l'épissage deviennent nécessaires.

#### 2.2.5 Présence de structures secondaires ?

Une autre explication du manque d'efficacité de *trans*-épissage pourrait être la prise de structures secondaires de l'intron à cibler ou du domaine de liaison du PTM. Bien connue dans le cas du *cis*-épissage, la prise de structures secondaires oriente le spliceosome pour l'épissage d'un exon particulier, malgré la présence d'hélicases lors de la réaction (Hiller et al., 2007). Dans le cadre d'une réaction de *trans*-épissage, la prise d'une structure secondaire par l'ARN pré-messager ciblé défavoriserait sa liaison avec le domaine de liaison du PTM. De même, une prise de structure secondaire stable par le domaine de liaison lui-même l'empêcherait de jouer son rôle. Nous avons cherché, en utilisant des outils bioinformatiques,

à évaluer les structures secondaires prises par ces deux éléments. Nous n'avons remarqué aucune structure secondaire très stable, ni dans le domaine de liaison, ni dans la cible. Cependant, l'analyse *in silico* des structures secondaires comporte quelques limites : i) les évaluations sont effectuées à partir d'algorithmes prenant leur source sur un nombre limité d'études, et changer d'outil bioinformatique peut être la source de résultats contradictoires, notamment quand la molécule analysée est longue, ii) ces évaluations ne tiennent pas compte des mécanismes cellulaires mis en œuvre pour déplier la molécule, et iii) plusieurs repliements sont souvent possibles pour un même transcrit.

Dans notre modèle d'étude, ces évaluations bioinformatiques suggèrent que la prise de structure secondaire n'est pas la source du manque d'efficacité de nos PTM.

#### 2.2.6 Problème de localisation des PTM ?

Une autre contrainte à laquelle le PTM doit faire face pour être efficace tient sa localisation dans le noyau. En effet, la transcription et l'épissage étant liés, tant au niveau temporel qu'au niveau mécanistique (Maniatis and Tasic, 2002), le PTM doit trouver sa cible avant qu'elle ne soit épissée. Une étude récente fait d'ailleurs le lien entre sites de transcription du PTM et de sa cible et efficacité de *trans*-épissage (Viles and Sullenger, 2008). Cette étude montre que dans certains cas, le site de transcription du PTM influence directement l'efficacité de réaction. Plus précisément, les auteurs ont travaillé avec des PTM dépourvus de domaines de liaison, et ont quantifié l'efficacité de *trans*-épissage entre le PTM et les transcrits issus de gènes avoisinant le site d'intégration du PTM. Cette étude montre que le PTM réagit très efficacement avec les ARN transcrits dans la proximité immédiate de sa propre production, mais beaucoup moins avec des transcrits distants. Cependant, pour une raison qui reste à élucider, cette observation ne fait pas preuve de vérité universelle : certaines réactions peuvent malgré tout avoir lieu entre deux molécules transcrites à partir de deux zones distantes du génome (Viles and Sullenger, 2008).

Dans notre cas, il est possible que l'expression du PTM à partir d'un site extrachromatinien distant du locus de la  $\beta$ -glucuronidase endogène ait influencé l'efficacité de réaction. Cependant, les études réalisées au préalable dans d'autres modèles utilisaient soit des plasmides, soit des vecteurs viraux (intégratifs ou non-intégratifs). Dans tous les cas, des évènements de *trans*-épissage ont pu être identifiés, sachant que dans le cas de vecteurs intégratifs, le site d'intégration n'a pas été choisi. Il semble donc que dans la majorité des cas, même si cette contrainte existe, son importance reste limitée si le PTM est lui-même efficace et cible correctement le transcrit d'intérêt.

Le tout est donc d'isoler un PTM efficace. Cependant, confrontés à la difficulté de mise en évidence des évènements de *trans*-épissage, nous nous sommes posé la question de la localisation du PTM. En l'occurrence, nous n'avons pas cherché à rapprocher les sites de productions des transcrits de la  $\beta$ -glucuronidase et du PTM. Nous avons plutôt essayé d'empêcher l'export des PTM n'ayant pas réagi vers le cytoplasme, et avons cherché à concentrer les PTM dans le noyau cellulaire, au niveau des sites d'épissage, à l'aide du snRNA U7.

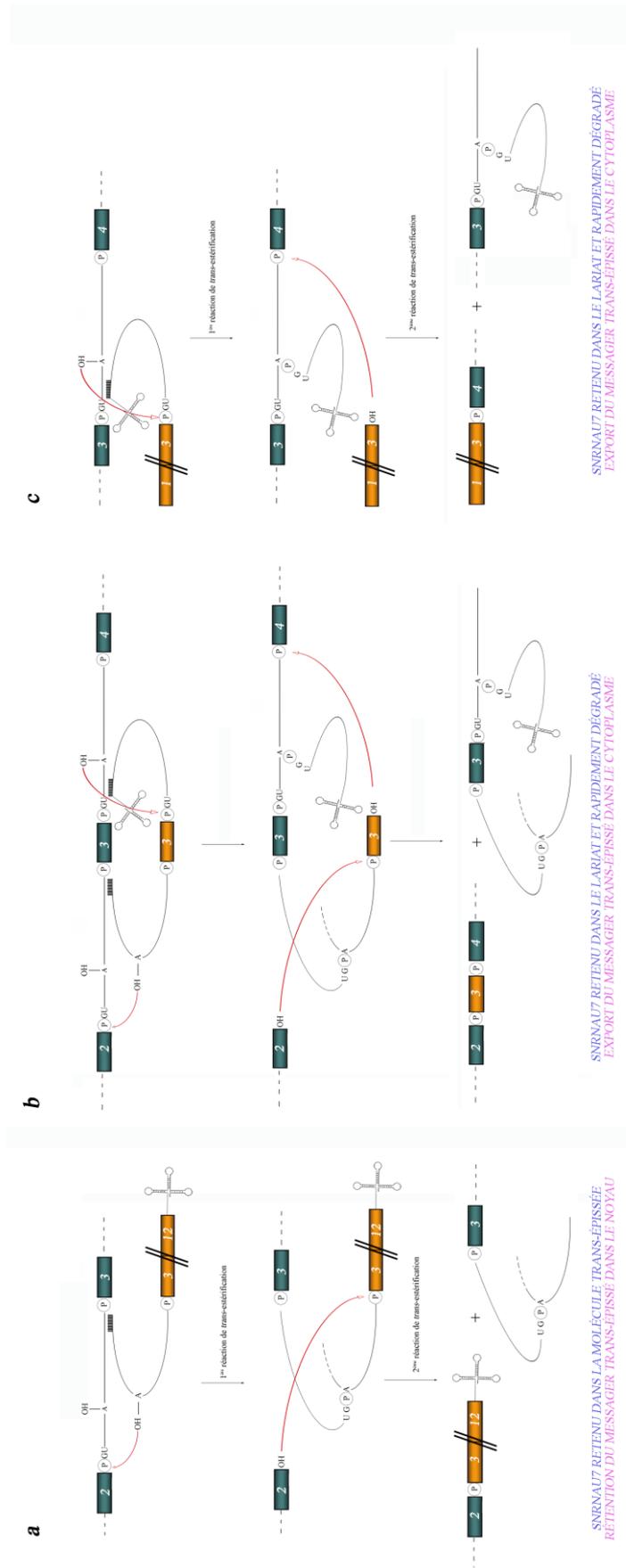
### 3 Stratégies testées pour augmenter l'efficacité de trans-épissage

#### 3.1 Utilisation du snRNA U7

Le problème de l'export des PTM dès leur transcription reste un point critique. Si l'export a lieu avant que le PTM n'ait eu le temps de réagir, alors il est « perdu » pour le *trans*-épissage. Nous avons donc essayé de bloquer le PTM dans le noyau et plus particulièrement dans les sites d'épissage, à l'aide du snRNA U7. Brièvement, le snRNA U7 est un snRNA non spliceosomal impliqué dans la maturation et le transport des ARN codant les histones (Dominski and Marzluff, 2007). Une version génétiquement modifiée existe et a été utilisée de nombreuses fois dans les stratégies d'exclusion et d'inclusion d'exon (Asparuhova et al., 2007; De Angelis et al., 2002; Goyenvalle et al., 2004; Liu et al., 2004; Marquis et al., 2008; Marquis et al., 2007; Suter et al., 1999) (Cf. **Chapitre 2.2.2.4** de l'introduction, p. 39). Il permet de concentrer les ARN antisens dans le noyau. Associé aux

PTM, le test de l'effet du snRNA U7 sur l'efficacité de *trans*-épissage montre qu'associé aux PTM 5', le snRNA U7 augmente l'efficacité de *trans*-épissage sur cible endogène, mais pas suffisamment pour permettre la détection de la protéine qui en est issue par Western blot. Associé au dPTM, nous avons encore eu du mal à détecter les molécules *trans*-épissées de façon reproductible. Enfin, associé au PTM 3', le snRNA U7 i) n'a pas d'effet au niveau moléculaire et ii) a un effet négatif au niveau protéique. En l'occurrence, le mode d'action du PTM 3' et le site de clonage du snRNA U7 que nous avons choisi entraîne la rétention du snRNA U7 sur la molécule d'ARN messenger mature produite par *trans*-épissage (**Figure 26a**). Par conséquent, nous pouvons penser que le snRNA U7, affiné aux composants du spliceosome, sera retenu dans le noyau. La molécule *trans*-épissée sera donc plus difficilement exportée et traduite. Il est d'ailleurs possible de retrouver cette observation dans la domaine de l'inclusion d'exon. L'équipe de Daniel Schümperli, en travaillant sur l'inclusion forcée de l'exon 7 de *smn2*, a utilisé le snRNA U7. Cette équipe a obtenu un taux d'inclusion de l'exon 7 de *smn2* de 97%, c'est-à-dire une inclusion supérieure à celle de *smn1*, dont le profil d'épissage est normal. Cependant, la quantité de protéine dans les mêmes cellules ne représentait que 40% de la quantité mesurée dans des cellules normales (Marquis et al., 2007). Ici aussi, il est possible que le snRNA U7, toujours lié à l'ARNm mature, retienne une partie des ARN dans le noyau et les empêche d'être exportés et traduits.

Il faut noter que ce problème ne serait pas rencontré avec les PTM 5' et les dPTM, puisque leur mode d'action implique l'excision du snRNA U7 lors de la réaction de *trans*-épissage s'il est inséré en 3' du PTM (**Figure 26b et 26c**).



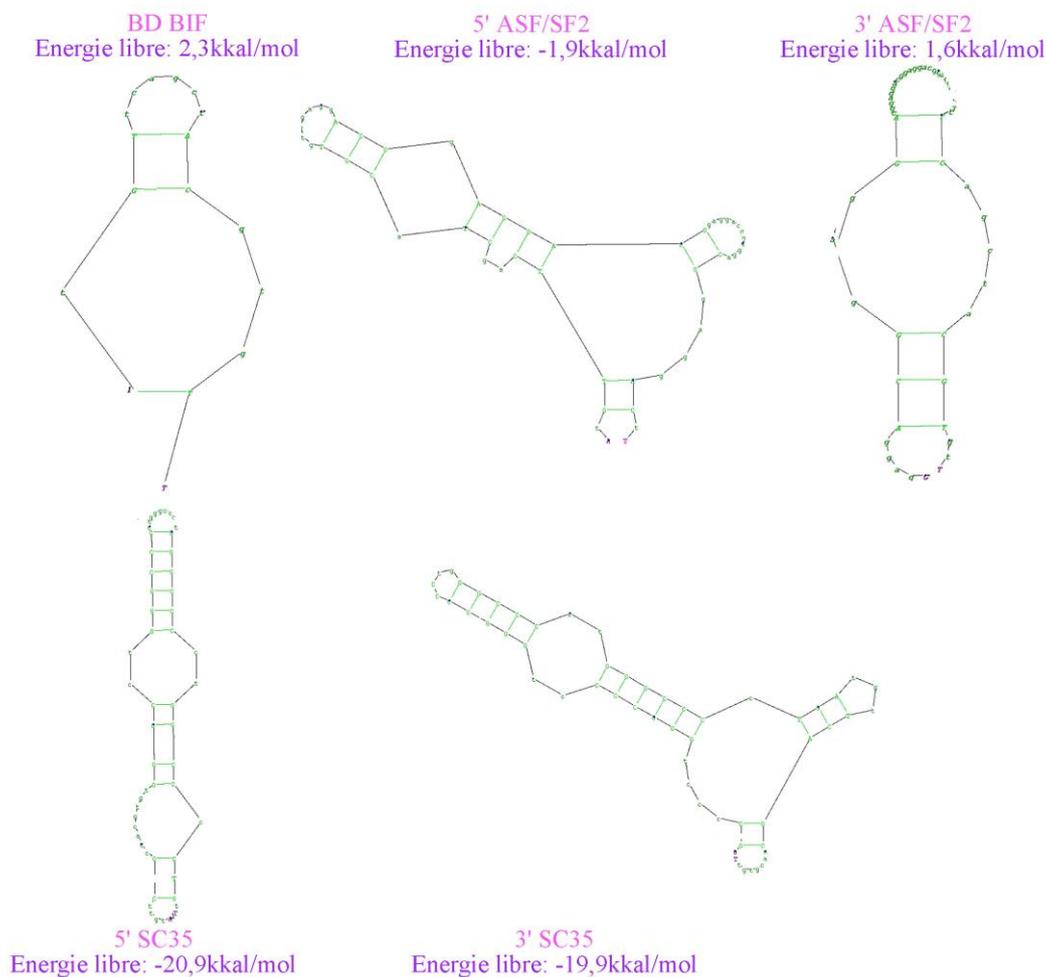
**Figure 26** *Rétention ou clivage du snRNA U7 à l'issue de la réaction de trans-épissage*  
**a:** dans le cas du PTM 3', le snRNA U7 est toujours présent à l'issue de la réaction de *trans-épissage*. Le snRNA U7 utilisé dans cette étude étant afin aux composants Sm du spliceosome, il est probable que ces protéines séquestrent une partie des molécules *trans-épissées* dans le noyau, les empêchant d'être exportées dans le cytoplasme et traduites, et résultant en une baisse de la quantité de protéines visible par western blot. **b et c :** dans le cas des dPTM et des PTM 5', le snRNA U7 sera excisé du PTM à l'issue de la réaction de *trans-épissage*, et sera joint au lariat, rapidement dégradé.

### 3.2 Utilisation des ARN bifonctionnels

Finally, the results that we obtained by adding bifunctional RNAs are encouraging. Briefly, bifunctional RNAs are simple RNA strands used to force the inclusion of exon 7 of *smn2* by recruiting splicing activators in the immediate environment of this exon (Baughan et al., 2006; Cartegni and Krainer, 2003; Marquis et al., 2008; Marquis et al., 2007; Meyer et al., 2008; Skordis et al., 2003). Recruited in the immediate environment of the PTM, we show that they allow to improve the efficiency of the reaction. This observation goes in the sense of a default of recognition and of takeover of the PTM by the spliceosome in normal conditions. In addition, the binding domain of bifunctional RNAs allows to increase the reaction of *trans*-splicing. Thus, we were able to visualize *trans*-splicing events after RT-PCR only (without having to perform a Southern blot to increase the detection threshold). The binding domain of bifunctional RNAs, hybridizing on a putative recognition site to a protein inhibitor of splicing, increases the inclusion of the PTM, which goes in the sense of the real presence of this site. A similar observation has also been previously described: if an antisense oligonucleotide hybridizes on the binding site of an hnRNP of exon 7 of *smn2*, then this exon is included in the mature mRNA (Cartegni and Krainer, 2003; Hua et al., 2007; Hua et al., 2008).

The addition of the ASF/SF2 tail does not significantly increase the efficiency of *trans*-splicing compared to the binding domain of bifunctional RNAs alone. It is probable that the lack of impact of the recruitment of ASF/SF2 on the efficiency of *trans*-splicing is due to the fact that ASF/SF2 is not involved in the natural inclusion of exon 3 of the  $\beta$ -glucuronidase. Nevertheless, to verify this, an interesting thing would be to increase the number of recruitment sequences of ASF/SF2. In fact, it has been shown that increasing this number directly impacts on the efficiency of exon inclusion (Cartegni and Krainer, 2003). In our case, we could have passed from 5 repetitions to 10, or even 15, and evaluate the effect of this increase.

De façon surprenante, en testant les ARN bifonctionnels SC35, nous avons observé une baisse de l'efficacité de *trans*-épissage par rapport à l'effet du domaine de liaison seul des ARN bifonctionnels. Comme tous les ARN bifonctionnels sont porteurs du même domaine de liaison, les ARN bifonctionnels SC35 devraient au moins être aussi efficaces que le domaine de liaison seul au regard de l'augmentation d'efficacité de *trans*-épissage. L'explication de cette baisse d'efficacité pourrait tenir du fait que les ARN bifonctionnels SC35 prennent une structure secondaire très stable, qui pourrait impacter directement sur leur réactivité, comme illustrée dans la **Figure 27**.



**Figure 27 : Structure secondaire des ARN bifonctionnels**

Une étude *in silico* ([http://www.genebee.msu.su/services/rna2\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html)) de la structure secondaire des ARN bifonctionnels utilisés dans notre étude montre que certains ARN ne se replient sur eux même que de façon très instable (le domaine de liaison des ARN bifonctionnels et les ARN bifonctionnels ASF/SF2). À l'inverse, d'autres se replient sur eux-mêmes de façon très stable : les ARN bifonctionnels SC35.

### 3.3 Autres méthodes pour augmenter l'efficacité de réaction

Malgré les résultats en demie teinte de cette étude, il faut se souvenir des articles ayant montré le pouvoir du *trans*-épissage comme outil de thérapie génique, et considérer ce que nous aurions pu faire de plus pour augmenter l'efficacité de réaction.

Premièrement, nous aurions pu tester l'effet synergique du snRNA U7 et des ARN bifonctionnels sur l'efficacité des PTM 5'. Pour ce faire, nous aurions pu créer un ARN bifonctionnel pourvu d'un domaine de liaison spécifique de la partie dégénérée de l'exon 3 du PTM 5', et l'associer à une queue SR capable de recruter la protéine ASF/SF2, particulièrement affine à la snRNP U1. La présence de ASF/SF2 dans l'environnement immédiat du PTM 5' aurait pu favoriser la liaison de la snRNP U1 sur le PTM, et ainsi augmenter l'efficacité d'inclusion du PTM.

De plus, à l'instar d'une étude récente (Coady et al., 2008), nous aurions pu bloquer l'inclusion de l'exon 4 de la  $\beta$ -glucuronidase pour favoriser celle du PTM. Cependant, dans leur étude dans le modèle SMA, les auteurs profitent du fait que l'exon 7 à reprogrammer n'est suivi que d'un seul exon. En bloquant l'épissage de ce dernier, ils ne risquent pas de voir l'exon 8 de *smn2* sauté par le spliceosome. Dans notre cas, l'utilisation d'un oligonucléotide antisens dirigé contre l'exon 4 de la  $\beta$ -glucuronidase pourrait se traduire par un saut de l'exon 4 ou l'activation d'un site cryptique d'épissage, sans réel effet sur la réaction de *trans*-épissage.

Nous aurions aussi pu ajouter des séquences introniques activatrices de l'épissage dans la partie intronique du PTM. Mieux encore, nous aurions pu créer les PTM de telle sorte que l'intron précédent ou suivant l'exon 3 (en fonction des PTM) soit présent dans la séquence codante. Leur présence aurait permis une meilleure reconnaissance du PTM par le spliceosome. Il a d'ailleurs été montré que la présence d'un intron dans la partie codante d'un PTM 5' augmentait de plus de 60 fois l'efficacité de *trans*-épissage (Mansfield et al., 2003). Pour autant, même si cela a été validé dans ce modèle d'étude, rien ne garantit qu'un tel intron, inséré dans un de nos PTM, ne soit correctement épissé. C'est pourquoi nous avons choisi de ne pas tester cette hypothèse.

# **CONCLUSION GENERALE**

L'étude présentée dans ce manuscrit n'avait pas un but clinique. Le modèle MPS VII nous a cependant permis de décortiquer de façon systématique un certain nombre de points critiques dans le domaine du *trans*-épissage. Un élément important qu'apporte notre étude est l'impossibilité de tester les PTM dans un environnement minigène avant de passer à l'environnement endogène naturel. Nous pouvons cependant comprendre la raison pour laquelle les expérimentateurs précédents ont choisi cette méthode : le travail sur minigène permet de déterminer rapidement et facilement si un PTM réagit ou non avec une cible. Il garantit donc les premiers résultats, même si ces résultats ne reflètent pas forcément les résultats qui seront obtenus par la suite dans l'environnement endogène. Bien sûr, tester les PTM directement dans l'environnement endogène paraît être une tâche difficile, puisque l'expérimentateur est soumis au manque de réactivité des PTM. Dans le domaine du *trans*-épissage, il faudrait donc décrire un moyen robuste pour augmenter l'efficacité de réaction de façon reproductible dans différents modèles pour permettre de futures applications. C'est pourquoi nous avons travaillé sur le snRNA U7 et les ARN bifonctionnels. Les observations que nous avons faites avec ces deux molécules apporteront peut être une solution au manque d'efficacité, si d'autres équipes s'intéressant au *trans*-épissage sont confrontées, comme nous, à un manque cruel de résultats facilement reproductibles.

D'une façon plus générale et personnelle, et même si l'étude présentée ici ne s'intéresse qu'à une possibilité parmi tant d'autres dans le domaine des stratégies correctrices, et si conclure sur ces approches *versus* les approches substitutives n'est pas facile, je dirais que les deux principaux enjeux des approches correctives sont aujourd'hui i) l'efficacité de correction et ii) la spécificité de correction.

Premièrement, il est strictement impossible de conclure sur l'inefficacité ou l'inapplicabilité clinique du transfert de gène. En effet, il a entre autres permis de soigner des enfants atteints de déficience immunitaire combinée sévère (X-SCID ET ADA-SCID) et des enfants atteints d'adrénoleucodystrophie (ALD) par exemple. De plus, un certain nombre d'essais chez l'Homme sont en cours, de l'hémophilie à la maladie de Parkinson en passant par la déficience en lipoprotéine lipase et la rétinite pigmentaire par exemple. Enfin, d'autres

essais sont planifiés, portés par des résultats pré-cliniques très encourageants. Son champ d'application évoluant avec la caractérisation des causes physiopathologiques des maladies, l'espoir qu'il suscite est énorme. Dans les maladies génétiques innées, les maladies acquises à prédisposition génétiques ou non, le transfert de gène pourrait s'avérer être une clé dans la réussite des traitements.

De plus, si je devais donner un avis sur les stratégies correctives, je dirais que le *trans*-épissage, l'altération ciblée de gène et la recombinaison homologue ne me paraissent, dans l'état, pas assez efficaces pour penser à un développement clinique, même si de très belles réussites font inmanquablement penser aux applications chez l'Homme de ces approches. Augmenter l'efficacité de réaction, de façon reproductible dans différents modèles, me semble être l'un des principaux enjeux. De plus, vérifier la spécificité de réaction est crucial avant leur développement clinique. Il faudra, de façon précise, en utilisant par exemple les possibilités de séquençage à haut débit qu'offrent les pyroséquenceurs de dernière génération, vérifier le degré de spécificité pour s'affranchir de l'existence d'évènements inappropriés, même rares, notamment au niveau du gène. De plus, concernant ces méthodes, les essais sur des modèles de gros animaux manquent encore aujourd'hui. Même si certaines études font part de la relevance de ces approches dans certains modèles de maladies, elles n'évaluent l'approche que dans des modèles de rongeurs. Leur applicabilité chez le gros animal semble être l'un des futurs enjeux.

Concernant les autres approches réparatrices, le saut d'exon et le RNAi ont déjà fait l'objet d'essais cliniques. Ici aussi, leurs champs d'applications s'étendent au fil des études. Ils vont de la recherche anticancéreuse à la lutte contre les agents pathogènes en passant par les maladies innées. Ici, l'efficacité ne semble pas limitante, mais la spécificité devra un jour être adressée, de même que la formulation des ARN antisens. La question a déjà été posée concernant le RNAi, le « off-targeting » est quelque chose de connu. Concernant le saut d'exon, se servir de puces à ARN ne semble pas être la solution. Pire, l'utilisation de pyroséquenceurs pourrait ne pas s'avérer concluante, puisque les profils d'épissage, y compris alternatifs, ne sont pas connus pour l'ensemble du transcriptome. L'effet aspécifique que pourrait avoir un oligonucléotide antisens pourrait alors être mal évalué.

Enfin, une approche de thérapie génique correctrice à laquelle je suis tenté de croire est l'édition de gène utilisant des nucléases. Même si beaucoup de questions se posent quant à l'utilisation des Zinc Finger Nucléases (et des Méganucléases), notamment au niveau de leur innocuité, et même si penser aujourd'hui « essais cliniques » en ce qui les concerne est prématuré, il me paraît facile d'imaginer que des développements ultérieurs permettront de résoudre un certain nombre de problèmes, notamment au niveau de leur spécificité d'action. Les possibilités qu'elles offrent sont inégalées, puisqu'une fois la réaction effectuée, nul besoin d'y revenir, le défaut est corrigé, de façon définitive.

**RÉFÉRENCES**

- Aagaard, L., and Rossi, J. J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 75-86.
- Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., Janson, A. A., den Dunnen, J. T., van Ommen, G. J., and van Deutekom, J. C. (2002). Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1, S71-77.
- Aartsma-Rus, A., and van Ommen, G. J. (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* 13, 1609-1624.
- Abel, U., Deichmann, A., Bartholomae, C., Schwarzwaelder, K., Glimm, H., Howe, S., Thrasher, A., Garrigue, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., *et al.* (2007). Real-time definition of non-randomness in the distribution of genomic events. *PLoS ONE* 2, e570.
- Al-Dosari, M., Zhang, G., Knapp, J. E., and Liu, D. (2006). Evaluation of viral and mammalian promoters for driving transgene expression in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 673-678.
- Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S. D., Partridge, T. A., and Lu, Q. L. (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 12, 175-177.
- Andrieu-Soler, C., Halhal, M., Boatright, J. H., Padove, S. A., Nickerson, J. M., Stodulkova, E., Stewart, R. E., Ciavatta, V. T., Doat, M., Jeanny, J. C., *et al.* (2007). Single-stranded oligonucleotide-mediated in vivo gene repair in the rd1 retina. *Mol Vis* 13, 692-706.
- Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N., and Ohkuma, S. (1993). Purification and characterization of lysosomal H(+)-ATPase. An anion-sensitive v-type H(+)-ATPase from rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 268, 5649-5660.
- Arnould, S., Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J. C., Stricher, F., Petit, A. S., Patin, A., Guillier, S., *et al.* (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol* 355, 443-458.
- Arnould, S., Perez, C., Cabaniols, J. P., Smith, J., Gouble, A., Grizot, S., Epinat, J. C., Duclert, A., Duchateau, P., and Paques, F. (2007). Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J Mol Biol* 371, 49-65.
- Asparuhova, M. B., Marti, G., Liu, S., Serhan, F., Trono, D., and Schumperli, D. (2007). Inhibition of HIV-1 multiplication by a modified U7 snRNA inducing Tat and Rev exon skipping. *J Gene Med* 9, 323-334.

- Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H., and Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther 11 Suppl 1*, S109-121.
- Avila, J. L., and Convit, J. (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem J 152*, 57-64.
- Baralle, D., and Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet 42*, 737-748.
- Bastedo, L., Sands, M. S., Lambert, D. T., Pisa, M. A., Birkenmeier, E., and Chang, P. L. (1994). Behavioral consequences of bone marrow transplantation in the treatment of murine mucopolysaccharidosis type VII. *J Clin Invest 94*, 1180-1186.
- Baughan, T., Shababi, M., Coady, T. H., Dickson, A. M., Tullis, G. E., and Lorson, C. L. (2006). Stimulating full-length SMN2 expression by delivering bifunctional RNAs via a viral vector. *Mol Ther 14*, 54-62.
- Baumkotter, J., and Cantz, M. (1983). Decreased ganglioside neuraminidase activity in fibroblasts from mucopolysaccharidosis patients. Inhibition of the activity in vitro by sulfated glycosaminoglycans and other compounds. *Biochim Biophys Acta 761*, 163-170.
- Beck, M. (2007). New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum Genet 121*, 1-22.
- Bektesh, S. L., and Hirsh, D. I. (1988). *C. elegans* mRNAs acquire a spliced leader through a trans-splicing mechanism. *Nucleic Acids Res 16*, 5692.
- Berges, B. K., Yellayi, S., Karolewski, B. A., Miselis, R. R., Wolfe, J. H., and Fraser, N. W. (2006). Widespread correction of lysosomal storage in the mucopolysaccharidosis type VII mouse brain with a herpes simplex virus type 1 vector expressing beta-glucuronidase. *Mol Ther 13*, 859-869.
- Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem 270*, 2411-2414.
- Bertoni, C., Morris, G. E., and Rando, T. A. (2005). Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing. *Hum Mol Genet 14*, 221-233.
- Bester, A. C., Schwartz, M., Schmidt, M., Garrigue, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., Ben-Porat, N., Von Kalle, C., Fischer, A., and Kerem, B. (2006). Fragile sites are preferential targets for integrations of MLV vectors in gene therapy. *Gene Ther 13*, 1057-1059.
- Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, J. K., and Carroll, D. (2006). Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics 172*, 2391-2403.
- Bhaumik, S., Walls, Z., Puttaraju, M., Mitchell, L. G., and Gambhir, S. S. (2004). Molecular imaging of gene expression in living subjects by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A 101*, 8693-8698.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science 300*, 764.

- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* *161*, 1169-1175.
- Birkenmeier, E. H., Barker, J. E., Vogler, C. A., Kyle, J. W., Sly, W. S., Gwynn, B., Levy, B., and Pegors, C. (1991). Increased life span and correction of metabolic defects in murine mucopolysaccharidosis type VII after syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* *78*, 3081-3092.
- Birkenmeier, E. H., Davisson, M. T., Beamer, W. G., Ganschow, R. E., Vogler, C. A., Gwynn, B., Lyford, K. A., Maltais, L. M., and Wawrzyniak, C. J. (1989). Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta-glucuronidase deficiency. *J Clin Invest* *83*, 1258-1266.
- Blankinship, M. J., Gregorevic, P., and Chamberlain, J. S. (2006). Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* *13*, 241-249.
- Blumenthal, T. (2005). Trans-splicing and operons. *WormBook* *25*, 1-9.
- Bostick, B., Yue, Y., Lai, Y., Long, C., Li, D., and Duan, D. (2008). Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum Gene Ther* *19*, 851-856.
- Brady, R. O. (2006). Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu Rev Med* *57*, 283-296.
- Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., and Chambon, P. (1978). Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 4853-4857.
- Breathnach, R., Mandel, J. L., and Chambon, P. (1977). Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* *270*, 314-319.
- Brown, B. D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L. S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., and Naldini, L. (2007a). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* *110*, 4144-4152.
- Brown, B. D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccharini, A., Lazzari, G., Galli, C., and Naldini, L. (2007b). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* *25*, 1457-1467.
- Carroll, D., Morton, J. J., Beumer, K. J., and Segal, D. J. (2006). Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases. *Nat Protoc* *1*, 1329-1341.

- Cartegni, L., Chew, S. L., and Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.
- Cartegni, L., Hastings, M. L., Calarco, J. A., de Stanchina, E., and Krainer, A. R. (2006). Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78, 63-77.
- Cartegni, L., and Krainer, A. R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30, 377-384.
- Cartegni, L., and Krainer, A. R. (2003). Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 10, 120-125.
- Cathomen, T., and Joung, J. K. (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* 16, 1200-1207.
- Caudevilla, C., Da Silva-Azevedo, L., Berg, B., Guhl, E., Graessmann, M., and Graessmann, A. (2001). Heterologous HIV-nef mRNA trans-splicing: a new principle how mammalian cells generate hybrid mRNA and protein molecules. *FEBS Lett* 507, 269-279.
- Chadeuf, G., Ciron, C., Moullier, P., and Salvetti, A. (2005). Evidence for encapsidation of prokaryotic sequences during recombinant adeno-associated virus production and their in vivo persistence after vector delivery. *Mol Ther* 12, 744-753.
- Chang, H. C., Hung, W. C., Chuang, Y. J., and Jong, Y. J. (2004). Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int* 45, 1107-1112.
- Chao, H., Mansfield, S. G., Bartel, R. C., Hiriyan, S., Mitchell, L. G., Garcia-Blanco, M. A., and Walsh, C. E. (2003). Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* 9, 1015-1019.
- Chao, H., Sun, L., Bruce, A., Xiao, X., and Walsh, C. E. (2002). Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther* 5, 716-722.
- Chebli, K., Gattoni, R., Schmitt, P., Hildwein, G., and Stevenin, J. (1989). The 216-nucleotide intron of the E1A pre-mRNA contains a hairpin structure that permits utilization of unusually distant branch acceptors. *Mol Cell Biol* 9, 4852-4861.
- Chen, H. Y., Kathirvel, P., Yee, W. C., and Lai, P. S. (2008a). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 16, 16.
- Chen, W. Y., Bailey, E. C., McCune, S. L., Dong, J. Y., and Townes, T. M. (1997). Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5798-5803.
- Chen, Z. Y., He, C. Y., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 8, 495-500.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chen, Z. Y., He, C. Y., and Kay, M. A. (2005). Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 16, 126-131.
- Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L., and Kay, M. A. (2004). Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 11, 856-864.
- Chen, Z. Y., Riu, E., He, C. Y., Xu, H., and Kay, M. A. (2008b). Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther* 16, 548-556.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J. E., Provost, N., Cherel, Y., Casadevall, N., Samulski, R. J., and Moullier, P. (2004a). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 103, 3303-3304.
- Chenuaud, P., Larcher, T., Rabinowitz, J. E., Provost, N., Joussemet, B., Bujard, H., Samulski, R. J., Favre, D., and Moullier, P. (2004b). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 9, 410-418.
- Choi, V. W., McCarty, D. M., and Samulski, R. J. (2005). AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5, 299-310.
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J. F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1968-1973.
- Ciron, C., Desmaris, N., Colle, M. A., Raoul, S., Joussemet, B., Verot, L., Ausseil, J., Froissart, R., Roux, F., Cherel, Y., *et al.* (2006). Gene therapy of the brain in the dog model of Hurler's syndrome. *Ann Neurol* 60, 204-213.
- Clouet d'Orval, B., d'Aubenton Carafa, Y., Sirand-Pugnet, P., Gallego, M., Brody, E., and Marie, J. (1991). RNA secondary structure repression of a muscle-specific exon in HeLa cell nuclear extracts. *Science* 252, 1823-1828.
- Coady, T. H., Baughan, T. D., Shababi, M., Passini, M. A., and Lorson, C. L. (2008). Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS ONE* 3, e3468.
- Coady, T. H., Shababi, M., Tullis, G. E., and Lorson, C. L. (2007). Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing. *Mol Ther* 15, 1471-1478.
- Constantopoulos, G., and Dekaban, A. S. (1978). Neurochemistry of the mucopolysaccharidoses: brain lipids and lysosomal enzymes in patients with four types of mucopolysaccharidosis and in normal controls. *J Neurochem* 30, 965-973.
- Cooke, C., and Alwine, J. C. (2002). Characterization of specific protein-RNA complexes associated with the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol Cell Biol* 22, 4579-4586.

Cooke, C., Hans, H., and Alwine, J. C. (1999). Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal. *Mol Cell Biol* *19*, 4971-4979.

Cornetta, K., Tricot, G., Broun, E. R., Hromas, R., Srour, E., Hoffman, R., Anderson, W. F., Moen, R. C., and Morgan, R. A. (1992). Retroviral-mediated gene transfer of bone marrow cells during autologous bone marrow transplantation for acute leukemia. *Hum Gene Ther* *3*, 305-318.

Cornu, T. I., and Cathomen, T. (2007). Targeted genome modifications using integrase-deficient lentiviral vectors. *Mol Ther* *15*, 2107-2113.

Cornu, T. I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichtinger, M., Joung, J. K., and Cathomen, T. (2008). DNA-binding specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther* *16*, 352-358.

Daly, T. M., Ohlemiller, K. K., Roberts, M. S., Vogler, C. A., and Sands, M. S. (2001). Prevention of systemic clinical disease in MPS VII mice following AAV-mediated neonatal gene transfer. *Gene Ther* *8*, 1291-1298.

Daly, T. M., Okuyama, T., Vogler, C., Haskins, M. E., Muzyczka, N., and Sands, M. S. (1999). Neonatal intramuscular injection with recombinant adeno-associated virus results in prolonged beta-glucuronidase expression in situ and correction of liver pathology in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Hum Gene Ther* *10*, 85-94.

De Angelis, F. G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., and Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9456-9461.

Deichmann, A., Hacein-Bey-Abina, S., Schmidt, M., Garrigue, A., Brugman, M. H., Hu, J., Glimm, H., Gyapay, G., Prum, B., Fraser, C. C., *et al.* (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* *117*, 2225-2232.

Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C. F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M. C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000). The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* *20*, 6287-6299.

Desnick, R. J., and Schuchman, E. H. (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat Rev Genet* *3*, 954-966.

Dickson, A., Osman, E., and Lorson, C. (2008). A Negatively-Acting Bifunctional RNA Increases Survival Motor Neuron in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*.

Distler, J., Hieber, V., Sahagian, G., Schmickel, R., and Jourdan, G. W. (1979). Identification of mannose 6-phosphate in glycoproteins that inhibit the assimilation of beta-galactosidase by fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4235-4239.

- Dominski, Z., and Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8673-8677.
- Dominski, Z., and Marzluff, W. F. (2007). Formation of the 3' end of histone mRNA: getting closer to the end. *Gene* *396*, 373-390.
- Dougherty, J. P., and Temin, H. M. (1987). A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 1197-1201.
- Du, L., Pollard, J. M., and Gatti, R. A. (2007). Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 6007-6012.
- Eliyahu, H., Barenholz, Y., and Domb, A. J. (2005). Polymers for DNA delivery. *Molecules* *10*, 34-64.
- Ellis, J. (2005). Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* *16*, 1241-1246.
- Epinat, J. C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., Patin, A., Zanghellini, A., Paques, F., and Lacroix, E. (2003). A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *31*, 2952-2962.
- Eul, J., Graessmann, M., and Graessmann, A. (1995). Experimental evidence for RNA trans-splicing in mammalian cells. *Embo J* *14*, 3226-3235.
- Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marme, F., Cherel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B., *et al.* (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* *76*, 11605-11611.
- Fedorova, O., and Zingler, N. (2007). Group II introns: structure, folding and splicing mechanism. *Biol Chem* *388*, 665-678.
- Feldkotter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T. F., and Wirth, B. (2002). Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* *70*, 358-368.
- Fratantoni, J. C., Hall, C. W., and Neufeld, E. F. (1968). Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science* *162*, 570-572.
- Frisella, W. A., O'Connor, L. H., Vogler, C. A., Roberts, M., Walkley, S., Levy, B., Daly, T. M., and Sands, M. S. (2001). Intracranial injection of recombinant adeno-associated virus improves cognitive function in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Mol Ther* *3*, 351-358.

- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T., and Nakao, M. (2003). Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278, 24132-24138.
- Futerman, A. H., and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 554-565.
- Fyfe, J. C., Kurzhals, R. L., Lassaline, M. E., Henthorn, P. S., Alur, P. R., Wang, P., Wolfe, J. H., Giger, U., Haskins, M. E., Patterson, D. F., *et al.* (1999). Molecular basis of feline beta-glucuronidase deficiency: an animal model of mucopolysaccharidosis VII. *Genomics* 58, 121-128.
- Gallego, M. E., Sirand-Pugnet, P., Durosay, P., Clouet d'Orval, B., d'Aubenton-Carafa, Y., Brody, E., Expert-Bezancon, A., and Marie, J. (1996). Tissue-specific splicing of two mutually exclusive exons of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA: positive and negative regulations. *Biochimie* 78, 457-465.
- Gao, G., Lebherz, C., Weiner, D. J., Grant, R., Calcedo, R., McCullough, B., Bagg, A., Zhang, Y., and Wilson, J. M. (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 103, 3300-3302.
- Garcia-Blanco, M. A. (2003). Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Clin Invest* 112, 474-480.
- Gavrilov, D. K., Shi, X., Das, K., Gilliam, T. C., and Wang, C. H. (1998). Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet* 20, 230-231.
- Gitzelmann, R., Bosshard, N. U., Superti-Furga, A., Spycher, M. A., Briner, J., Wiesmann, U., Lutz, H., and Litschi, B. (1994). Feline mucopolysaccharidosis VII due to beta-glucuronidase deficiency. *Vet Pathol* 31, 435-443.
- Gorlach, M., Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994). The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. *J Biol Chem* 269, 23074-23078.
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schumperli, D., and Kole, R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4929-4934.
- Goto, M., Sawamura, D., Nishie, W., Sakai, K., McMillan, J. R., Akiyama, M., and Shimizu, H. (2006). Targeted skipping of a single exon harboring a premature termination codon mutation: implications and potential for gene correction therapy for selective dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Invest Dermatol* 126, 2614-2620.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796-1799.

- Grabowski, P. J. (2000). Genetic evidence for a Nova regulator of alternative splicing in the brain. *Neuron* 25, 254-256.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6, 1197-1211.
- Gregorevic, P., Allen, J. M., Minami, E., Blankinship, M. J., Haraguchi, M., Meuse, L., Finn, E., Adams, M. E., Froehner, S. C., Murry, C. E., and Chamberlain, J. S. (2006). rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* 12, 787-789.
- Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M., Crawford, R. W., Meuse, L., Miller, D. G., Russell, D. W., and Chamberlain, J. S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 10, 828-834.
- Grubb, J. H., Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Tan, Y., and Sly, W. S. (2008a). Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2616-2621.
- Grubb, J. H., Vogler, C., Tan, Y., Shah, G. N., Macrae, A. F., and Sly, W. S. (2008b). Infused Fc-tagged {beta}-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., *et al.* (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003a). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-256.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003b). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., Harper, H. A., Robinson, A. S., Engelhardt, J. F., Brooks, S. V., and Chamberlain, J. S. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 8, 253-261.
- Haskins, M., and Giger, U. (1997). Lysosomal storage diseases. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (fifth ed), Academic Press, San Diego, CA (1997), 5, 741-760.

- Haskins, M. E., Desnick, R. J., DiFerrante, N., Jezyk, P. F., and Patterson, D. F. (1984). Beta-glucuronidase deficiency in a dog: a model of human mucopolysaccharidosis VII. *Pediatr Res* 18, 980-984.
- Hawley, R. G., Covarrubias, L., Hawley, T., and Mintz, B. (1987). Handicapped retroviral vectors efficiently transduce foreign genes into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2406-2410.
- Hendrie, P. C., and Russell, D. W. (2005). Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther* 12, 9-17.
- Herzog, R. W., Mount, J. D., Arruda, V. R., High, K. A., and Lothrop, C. D., Jr. (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 4, 192-200.
- High, K. A. (2005). Gene therapy: the moving finger. *Nature* 435, 577-579.
- Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., and Stamm, S. (2007). Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet* 3, e204.
- Hofmann, Y., Lorson, C. L., Stamm, S., Androphy, E. J., and Wirth, B. (2000). Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9618-9623.
- Hopwood, J. J., and Morris, C. P. (1990). The mucopolysaccharidoses. Diagnosis, molecular genetics and treatment. *Mol Biol Med* 7, 381-404.
- House, A. E., and Lynch, K. W. (2008). Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *J Biol Chem* 283, 1217-1221.
- Hua, Y., Vickers, T. A., Baker, B. F., Bennett, C. F., and Krainer, A. R. (2007). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* 5, e73.
- Hua, Y., Vickers, T. A., Okunola, H. L., Bennett, C. F., and Krainer, A. R. (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 82, 834-848.
- Huttner, N. A., Girod, A., Perabo, L., Edbauer, D., Kleinschmidt, J. A., Buning, H., and Hallek, M. (2003). Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene Ther* 10, 2139-2147.
- Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N. M., Wu, X., and Nakai, H. (2008). Frequency and spectrum of genomic integration of recombinant adeno-associated virus serotype 8 vector in neonatal mouse liver. *J Virol* 82, 9513-9524.
- Islam, M. R., Tomatsu, S., Shah, G. N., Grubb, J. H., Jain, S., and Sly, W. S. (1999). Active site residues of human beta-glucuronidase. Evidence for Glu(540) as the nucleophile and Glu(451) as the acid-base residue. *J Biol Chem* 274, 23451-23455.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78, 657-668.

- Jain, S., Drendel, W. B., Chen, Z. W., Mathews, F. S., Sly, W. S., and Grubb, J. H. (1996). Structure of human beta-glucuronidase reveals candidate lysosomal targeting and active-site motifs. *Nat Struct Biol* 3, 375-381.
- Jeffreys, A. J., and Flavell, R. A. (1977). The rabbit beta-globin gene contains a large large insert in the coding sequence. *Cell* 12, 1097-1108.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.
- Jooss, K., Yang, Y., Fisher, K. J., and Wilson, J. M. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 72, 4212-4223.
- Jung, H. S., and Lee, S. W. (2006). Ribozyme-mediated selective killing of cancer cells expressing carcinoembryonic antigen RNA by targeted trans-splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 556-563.
- Kalbfuss, B., Mabon, S. A., and Misteli, T. (2001). Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *J Biol Chem* 276, 42986-42993.
- Kaplan, A., Achord, D. T., and Sly, W. S. (1977). Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2026-2030.
- Karras, J. G., Maier, M. A., Lu, T., Watt, A., and Manoharan, M. (2001). Peptide nucleic acids are potent modulators of endogenous pre-mRNA splicing of the murine interleukin-5 receptor-alpha chain. *Biochemistry* 40, 7853-7859.
- Karras, J. G., McKay, R. A., Dean, N. M., and Monia, B. P. (2000). Deletion of individual exons and induction of soluble murine interleukin-5 receptor-alpha chain expression through antisense oligonucleotide-mediated redirection of pre-mRNA splicing. *Mol Pharmacol* 58, 380-387.
- Kashima, T., and Manley, J. L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34, 460-463.
- Kashima, T., Rao, N., David, C. J., and Manley, J. L. (2007). hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet* 16, 3149-3159.
- Kastanos, E., Hjiantoniou, E., and Phylactou, L. A. (2004). Restoration of protein synthesis in pancreatic cancer cells by trans-splicing ribozymes. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 930-934.
- Katz, R. A., Jack-Scott, E., Narezkina, A., Palagin, I., Boimel, P., Kulkosky, J., Nicolas, E., Greger, J. G., and Skalka, A. M. (2007). High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms. *J Virol* 81, 2592-2604.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Khani, S. C., Pawlyk, B. S., Bulgakov, O. V., Kasperek, E., Young, J. E., Adamian, M., Sun, X., Smith, A. J., Ali, R. R., and Li, T. (2007). AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3954-3961.
- Khoo, B., Roca, X., Chew, S. L., and Krainer, A. R. (2007). Antisense oligonucleotide-induced alternative splicing of the APOB mRNA generates a novel isoform of APOB. *BMC Mol Biol* 8, 3.
- Kikumori, T., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2001). Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy? *Hum Gene Ther* 12, 1429-1441.
- Kikumori, T., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2002). Naturally occurring heterologous trans-splicing of adenovirus RNA with host cellular transcripts during infection. *FEBS Lett* 522, 41-46.
- Kim, Y. G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1156-1160.
- Kint, J. A., Dacremont, G., Carton, D., Orye, E., and Hooft, C. (1973). Mucopolysaccharidosis: secondarily induced abnormal distribution of lysosomal isoenzymes. *Science* 181, 352-354.
- Kirik, D., Georgievska, B., and Bjorklund, A. (2004). Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 105-110.
- Kole, R., Vacek, M., and Williams, T. (2004). Modification of alternative splicing by antisense therapeutics. *Oligonucleotides* 14, 65-74.
- Kosuga, M., Takahashi, S., Sasaki, K., Li, X. K., Fujino, M., Hamada, H., Suzuki, S., Yamada, M., Matsuo, N., and Okuyama, T. (2000). Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII: involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene products and long-term effects of CTLA-4Ig coexpression. *Mol Ther* 1, 406-413.
- Kotin, R. M., Linden, R. M., and Berns, K. I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* 11, 5071-5078.
- Kren, B. T., Parashar, B., Bandyopadhyay, P., Chowdhury, N. R., Chowdhury, J. R., and Steer, C. J. (1999). 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* 96, 10349-10354.
- Kyle, J. W., Birkenmeier, E. H., Gwynn, B., Vogler, C., Hoppe, P. C., Hoffmann, J. W., and Sly, W. S. (1990). Correction of murine mucopolysaccharidosis VII by a human beta-glucuronidase transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3914-3918.
- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., and Duan, D. (2006). Synthetic intron improves transduction efficiency of trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 17, 1036-1042.

- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., Ghosh, A., Engelhardt, J. F., Chamberlain, J. S., and Duan, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol* 23, 1435-1439.
- Lan, N., Howrey, R. P., Lee, S. W., Smith, C. A., and Sullenger, B. A. (1998). Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science* 280, 1593-1596.
- Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., and Del Gatto-Konczak, F. (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J Biol Chem* 276, 40638-40646.
- Le Guiner, C., Stieger, K., Snyder, R. O., Rolling, F., and Moullier, P. (2007). Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther* 7, 334-346.
- Lebedeva, I., and Stein, C. A. (2001). Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 403-419.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., and et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155-165.
- Li, H., Wang, J., Mor, G., and Sklar, J. (2008a). A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells. *Science* 321, 1357-1361.
- Li, J., Sun, W., Wang, B., Xiao, X., and Liu, X. Q. (2008b). Protein trans-splicing as a means for viral vector-mediated in vivo gene therapy. *Hum Gene Ther* 19, 958-964.
- Li, S., Kimura, E., Fall, B. M., Reyes, M., Angello, J. C., Welikson, R., Hauschka, S. D., and Chamberlain, J. S. (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther* 12, 1099-1108.
- Lim, S. R., and Hertel, K. J. (2001). Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J Biol Chem* 276, 45476-45483.
- Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K. I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11288-11294.
- Liu, L., Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E. B. (2003). The development and regulation of gene repair. *Nat Rev Genet* 4, 679-689.
- Liu, M., Yue, Y., Harper, S. Q., Grange, R. W., Chamberlain, J. S., and Duan, D. (2005a). Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* 11, 245-256.
- Liu, S., Asparuhova, M., Brondani, V., Ziekau, I., Klimkait, T., and Schumperli, D. (2004). Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res* 32, 3752-3759.

- Liu, X., Jiang, Q., Mansfield, S. G., Puttaraju, M., Zhang, Y., Zhou, W., Cohn, J. A., Garcia-Blanco, M. A., Mitchell, L. G., and Engelhardt, J. F. (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol* *20*, 47-52.
- Liu, X., Luo, M., Zhang, L. N., Yan, Z., Zak, R., Ding, W., Mansfield, S. G., Mitchell, L. G., and Engelhardt, J. F. (2005b). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* *16*, 1116-1123.
- Lo, H. W., Day, C. P., and Hung, M. C. (2005). Cancer-specific gene therapy. *Adv Genet* *54*, 235-255.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C. M., Colleoni, S., Lee, Y. L., Kim, K. A., Ando, D., Urnov, F. D., Galli, C., Gregory, P. D., *et al.* (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* *25*, 1298-1306.
- Lorson, C. L., and Androphy, E. J. (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* *9*, 259-265.
- Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J., and Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6307-6311.
- Lunn, M. R., and Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet* *371*, 2120-2133.
- Luzio, J. P., Rous, B. A., Bright, N. A., Pryor, P. R., Mullock, B. M., and Piper, R. C. (2000). Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* *113*, 1515-1524.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., and Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* *114*, 100-109.
- Madocsai, C., Lim, S. R., Geib, T., Lam, B. J., and Hertel, K. J. (2005). Correction of SMN2 Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol Ther* *12*, 1013-1022.
- Maeder, M. L., Thibodeau-Beganny, S., Osiaik, A., Wright, D. A., Anthony, R. M., Eichinger, M., Jiang, T., Foley, J. E., Winfrey, R. J., Townsend, J. A., *et al.* (2008). Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell* *31*, 294-301.
- Maniatis, T., and Tasic, B. (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* *418*, 236-243.
- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* *12*, 342-347.

- Mansfield, S. G., Chao, H., and Walsh, C. E. (2004). RNA repair using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Trends Mol Med* 10, 263-268.
- Mansfield, S. G., Clark, R. H., Puttaraju, M., Kole, J., Cohn, J. A., Mitchell, L. G., and Garcia-Blanco, M. A. (2003). 5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Rna* 9, 1290-1297.
- Mansfield, S. G., Kole, J., Puttaraju, M., Yang, C. C., Garcia-Blanco, M. A., Cohn, J. A., and Mitchell, L. G. (2000). Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther* 7, 1885-1895.
- Marechal, V., Naffakh, N., Danos, O., and Heard, J. M. (1993). Disappearance of lysosomal storage in spleen and liver of mucopolysaccharidosis VII mice after transplantation of genetically modified bone marrow cells. *Blood* 82, 1358-1365.
- Marquis, J., Kampfer, S. S., Angehrn, L., and Schumperli, D. (2008). Doxycycline-controlled splicing modulation by regulated antisense U7 snRNA expression cassettes. *Gene Ther*.
- Marquis, J., Meyer, K., Angehrn, L., Kampfer, S. S., Rothen-Rutishauser, B., and Schumperli, D. (2007). Spinal muscular atrophy: SMN2 pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol Ther* 15, 1479-1486.
- Martin, B., Sainlos, M., Aissaoui, A., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Vigneron, J. P., Lehn, J. M., and Lehn, P. (2005). The design of cationic lipids for gene delivery. *Curr Pharm Des* 11, 375-394.
- Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-398.
- Mayeda, A., Sreaton, G. R., Chandler, S. D., Fu, X. D., and Krainer, A. R. (1999). Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol Cell Biol* 19, 1853-1863.
- Mayer, M. G., and Floeter-Winter, L. M. (2005). Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplasts to mammals, an easy language for life diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 501-513.
- McAndrew, P. E., Parsons, D. W., Simard, L. R., Rochette, C., Ray, P. N., Mendell, J. R., Prior, T. W., and Burghes, A. H. (1997). Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 60, 1411-1422.
- McCormack, M. P., and Rabbitts, T. H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 350, 913-922.
- McInerney, J. M., Nawrocki, J. R., and Lowrey, C. H. (2000). Long-term silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine. *Gene Ther* 7, 653-663.
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., and Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281, 249-254.

- Mercatante, D. R., Mohler, J. L., and Kole, R. (2002). Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem* *277*, 49374-49382.
- Mercatante, D. R., Sazani, P., and Kole, R. (2001). Modification of alternative splicing by antisense oligonucleotides as a potential chemotherapy for cancer and other diseases. *Curr Cancer Drug Targets* *1*, 211-230.
- Meyer, K., Marquis, J., Trub, J., Nlend Nlend, R., Verp, S., Ruepp, M. D., Imboden, H., Barde, I., Trono, D., and Schumperli, D. (2008). Rescue of a severe mouse model for Spinal Muscular Atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Hum Mol Genet* *13*, 13.
- Miao, C. H., Snyder, R. O., Schowalter, D. B., Patijn, G. A., Donahue, B., Winther, B., and Kay, M. A. (1998). The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet* *19*, 13-15.
- Miller, D. G., Wang, P. R., Petek, L. M., Hirata, R. K., Sands, M. S., and Russell, D. W. (2006). Gene targeting in vivo by adeno-associated virus vectors. *Nat Biotechnol* *24*, 1022-1026.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., *et al.* (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* *25*, 778-785.
- Minczuk, M., Papworth, M. A., Miller, J. C., Murphy, M. P., and Klug, A. (2008). Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* *36*, 3926-3938.
- Mingozzi, F., Hasbrouck, N. C., Basner-Tschakarjan, E., Edmonson, S. A., Hui, D. J., Sabatino, D. E., Zhou, S., Wright, J. F., Jiang, H., Pierce, G. F., *et al.* (2007). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* *110*, 2334-2341.
- Mingozzi, F., Kleefstra, A., Meulenberg, J., Edmonson, S., Morin, D., Gaudet, P., Van Deventer, S., and High, K. A. (2008). Modulation of T cell response to the AAV capsid in subjects undergoing intramuscular gene transfer for lipoprotein lipase deficiency. *Hum Gene Ther* *19*, 1090.
- Mitani, K., Wakamiya, M., Hasty, P., Graham, F. L., Bradley, A., and Caskey, C. T. (1995). Gene targeting in mouse embryonic stem cells with an adenoviral vector. *Somat Cell Mol Genet* *21*, 221-231.
- Mitchell, L. G., and McGarrity, G. J. (2005). Gene therapy progress and prospects: reprogramming gene expression by trans-splicing. *Gene Ther* *12*, 1477-1485.
- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., and Bushman, F. D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* *2*, E234.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Miyagi, N., Rao, V. P., Ricci, D., Du, Z., Byrne, G. W., Bailey, K. R., Nakai, H., Russell, S. J., and McGregor, C. G. (2008). Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector. *J Heart Lung Transplant* 27, 554-560.
- Moehle, E. A., Rock, J. M., Lee, Y. L., Jouvenot, Y., DeKolver, R. C., Gregory, P. D., Urnov, F. D., and Holmes, M. C. (2007). Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3055-3060.
- Mohamedali, A., Moreau-Gaudry, F., Richard, E., Xia, P., Nolta, J., and Malik, P. (2004). Self-inactivating lentiviral vectors resist proviral methylation but do not confer position-independent expression in hematopoietic stem cells. *Mol Ther* 10, 249-259.
- Mok, H. P., and Lever, A. M. (2007). Chromatin, gene silencing and HIV latency. *Genome Biol* 8, 228.
- Monani, U. R., Lorson, C. L., Parsons, D. W., Prior, T. W., Androphy, E. J., Burghes, A. H., and McPherson, J. D. (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8, 1177-1183.
- Montano, A. M., Oikawa, H., Tomatsu, S., Nishioka, T., Vogler, C., Gutierrez, M. A., Oguma, T., Tan, Y., Grubb, J. H., Dung, V. C., *et al.* (2008). Acidic amino acid tag enhances response to enzyme replacement in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Genet Metab* 94, 178-189.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G., and Patel, S. D. (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* 74, 1761-1766.
- Moullier, P., Bohl, D., Cardoso, J., Heard, J. M., and Danos, O. (1995). Long-term delivery of a lysosomal enzyme by genetically modified fibroblasts in dogs. *Nat Med* 1, 353-357.
- Moullier, P., Bohl, D., Heard, J. M., and Danos, O. (1993a). Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. *Nat Genet* 4, 154-159.
- Moullier, P., Marechal, V., Danos, O., and Heard, J. M. (1993b). Continuous systemic secretion of a lysosomal enzyme by genetically modified mouse skin fibroblasts. *Transplantation* 56, 427-432.
- Muenzer, J. (2004). The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr* 144, S27-34.
- Munroe, S. H. (1988). Antisense RNA inhibits splicing of pre-mRNA in vitro. *Embo J* 7, 2523-2532.

- Nakai, H., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2000). Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol* *18*, 527-532.
- Nakama, H., Ohsugi, K., Otsuki, T., Date, I., Kosuga, M., Okuyama, T., and Sakuragawa, N. (2006). Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med* *209*, 23-32.
- Nakayama, K., Pergolizzi, R. G., and Crystal, R. G. (2005). Gene transfer-mediated pre-mRNA segmental trans-splicing as a strategy to deliver intracellular toxins for cancer therapy. *Cancer Res* *65*, 254-263.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* *393*, 386-389.
- Natowicz, M. R., Chi, M. M., Lowry, O. H., and Sly, W. S. (1979). Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of beta-glucuronidase by human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4322-4326.
- Newell-Price, J., Clark, A. J., and King, P. (2000). DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 142-148.
- Newman, A. (2001). Molecular biology. RNA enzymes for RNA splicing. *Nature* *413*, 695-696.
- O'Connor, L. H., Erway, L. C., Vogler, C. A., Sly, W. S., Nicholes, A., Grubb, J., Holmberg, S. W., Levy, B., and Sands, M. S. (1998). Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function. *J Clin Invest* *101*, 1394-1400.
- Ohashi, T., Watabe, K., Uehara, K., Sly, W. S., Vogler, C., and Eto, Y. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human beta-glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1287-1292.
- Oshima, A., Kyle, J. W., Miller, R. D., Hoffmann, J. W., Powell, P. P., Grubb, J. H., Sly, W. S., Tropak, M., Guise, K. S., and Gravel, R. A. (1987). Cloning, sequencing, and expression of cDNA for human beta-glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 685-689.
- Pacak, C. A., Sakai, Y., Thattaliyath, B. D., Mah, C. S., and Byrne, B. J. (2008). Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice. *Genet Vaccines Ther* *6*, 13.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., and Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 581-593.
- Pai, S. I., Lin, Y. Y., Macaes, B., Meneshian, A., Hung, C. F., and Wu, T. C. (2006). Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther* *13*, 464-477.

- Paques, F., and Duchateau, P. (2007). Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7, 49-66.
- Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E. B. (2007). Progress and prospects: targeted gene alteration (TGA). *Gene Ther* 14, 1675-1680.
- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Cherel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., and Snyder, R. O. (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 82, 7875-7885.
- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V. V., Lee, Y. L., *et al.* (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26, 808-816.
- Pergolizzi, R. G., Ropper, A. E., Dragos, R., Reid, A. C., Nakayama, K., Tan, Y., Ehteshami, J. R., Coleman, S. H., Silver, R. B., Hackett, N. R., *et al.* (2003). In vivo trans-splicing of 5' and 3' segments of pre-mRNA directed by corresponding DNA sequences delivered by gene transfer. *Mol Ther* 8, 999-1008.
- Persano, L., Crescenzi, M., and Indraccolo, S. (2007). Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol Aspects Med* 28, 87-114.
- Philpott, N. J., Gomos, J., Berns, K. I., and Falck-Pedersen, E. (2002). A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12381-12385.
- Philpott, N. J., and Thrasher, A. J. (2007). Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 18, 483-489.
- Phylactou, L. A., Darrah, C., and Wood, M. J. (1998). Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet* 18, 378-381.
- Ponder, K. P., Melniczek, J. R., Xu, L., Weil, M. A., O'Malley, T. M., O'Donnell, P. A., Knox, V. W., Aguirre, G. D., Mazrier, H., Ellinwood, N. M., *et al.* (2002). Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13102-13107.
- Poorthuis, B. J., Wevers, R. A., Kleijer, W. J., Groener, J. E., de Jong, J. G., van Weely, S., Niezen-Koning, K. E., and van Diggelen, O. P. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 105, 151-156.
- Porteus, M. H. (2006). Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol Ther* 13, 438-446.
- Porteus, M. H., and Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300, 763.
- Porteus, M. H., and Carroll, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967-973.

- Pozzoli, U., and Sironi, M. (2005). Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62, 1579-1604.
- Pruett-Miller, S. M., Connelly, J. P., Maeder, M. L., Joung, J. K., and Porteus, M. H. (2008). Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells. *Mol Ther* 16, 707-717.
- Puttaraju, M., DiPasquale, J., Baker, C. C., Mitchell, L. G., and Garcia-Blanco, M. A. (2001). Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther* 4, 105-114.
- Puttaraju, M., Jamison, S. F., Mansfield, S. G., Garcia-Blanco, M. A., and Mitchell, L. G. (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol* 17, 246-252.
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Muller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I., Winfrey, R. J., Sander, J. D., Fu, F., Townsend, J. A., *et al.* (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods* 5, 374-375.
- Rando, T. A., Disatnik, M. H., and Zhou, L. Z. (2000). Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5363-5368.
- Rautmann, G., and Breathnach, R. (1985). A role for branchpoints in splicing in vivo. *Nature* 315, 430-432.
- Ray, J., Bouvet, A., DeSanto, C., Fyfe, J. C., Xu, D., Wolfe, J. H., Aguirre, G. D., Patterson, D. F., Haskins, M. E., and Henthorn, P. S. (1998). Cloning of the canine beta-glucuronidase cDNA, mutation identification in canine MPS VII, and retroviral vector-mediated correction of MPS VII cells. *Genomics* 48, 248-253.
- Ray, J., Scarpino, V., Laing, C., and Haskins, M. E. (1999). Biochemical basis of the beta-glucuronidase gene defect causing canine mucopolysaccharidosis VII. *J Hered* 90, 119-123.
- Read, M. L., Logan, A., and Seymour, L. W. (2005). Barriers to gene delivery using synthetic vectors. *Adv Genet* 53, 19-46.
- Renshaw, J., Orr, R. M., Walton, M. I., Te Poele, R., Williams, R. D., Wancewicz, E. V., Monia, B. P., Workman, P., and Pritchard-Jones, K. (2004). Disruption of WT1 gene expression and exon 5 splicing following cytotoxic drug treatment: antisense down-regulation of exon 5 alters target gene expression and inhibits cell survival. *Mol Cancer Ther* 3, 1467-1484.
- Rivera, V. M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J. F., Keenan, T., Magari, S. R., Phillips, T., Courage, N. L., Cerasoli, F., Jr., *et al.* (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 2, 1028-1032.
- Rodriguez-Martin, T., Garcia-Blanco, M. A., Mansfield, S. G., Grover, A. C., Hutton, M., Yu, Q., Zhou, J., Anderton, B. H., and Gallo, J. M. (2005). Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15659-15664.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rosen, L. E., Morrison, H. A., Masri, S., Brown, M. J., Springstubb, B., Sussman, D., Stoddard, B. L., and Seligman, L. M. (2006). Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Res* 34, 4791-4800.
- Ross, C. J., Bastedo, L., Maier, S. A., Sands, M. S., and Chang, P. L. (2000). Treatment of a lysosomal storage disease, mucopolysaccharidosis VII, with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther* 11, 2117-2127.
- Rossi, J. J., June, C. H., and Kohn, D. B. (2007). Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol* 25, 1444-1454.
- Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6064-6068.
- Sammarco, C., Weil, M., Just, C., Weimelt, S., Hasson, C., O'Malley, T., Evans, S. M., Wang, P., Casal, M. L., Wolfe, J., and Haskins, M. (2000). Effects of bone marrow transplantation on the cardiovascular abnormalities in canine mucopolysaccharidosis VII. *Bone Marrow Transplant* 25, 1289-1297.
- Samson, S. L., and Chan, L. (2006). Gene therapy for diabetes: reinventing the islet. *Trends Endocrinol Metab* 17, 92-100.
- Sands, M. S., and Birkenmeier, E. H. (1993). A single-base-pair deletion in the beta-glucuronidase gene accounts for the phenotype of murine mucopolysaccharidosis type VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6567-6571.
- Sands, M. S., and Davidson, B. L. (2006). Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13, 839-849.
- Sands, M. S., Erway, L. C., Vogler, C., Sly, W. S., and Birkenmeier, E. H. (1995). Syngeneic bone marrow transplantation reduces the hearing loss associated with murine mucopolysaccharidosis type VII. *Blood* 86, 2033-2040.
- Sands, M. S., Vogler, C., Kyle, J. W., Grubb, J. H., Levy, B., Galvin, N., Sly, W. S., and Birkenmeier, E. H. (1994). Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII. *J Clin Invest* 93, 2324-2331.
- Sands, M. S., Vogler, C. A., Ohlemiller, K. K., Roberts, M. S., Grubb, J. H., Levy, B., and Sly, W. S. (2001). Biodistribution, kinetics, and efficacy of highly phosphorylated and non-phosphorylated beta-glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII. *J Biol Chem* 276, 43160-43165.
- Santiago, Y., Chan, E., Liu, P. Q., Orlando, S., Zhang, L., Urnov, F. D., Holmes, M. C., Guschin, D., Waite, A., Miller, J. C., *et al.* (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5809-5814.

- Scaffidi, P., and Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* *11*, 440-445.
- Schmidt, M., Hacein-Bey-Abina, S., Wissler, M., Carlier, F., Lim, A., Prinz, C., Glimm, H., Andre-Schmutz, I., Hue, C., Garrigue, A., *et al.* (2005). Clonal evidence for the transduction of CD34+ cells with lymphomyeloid differentiation potential and self-renewal capacity in the SCID-X1 gene therapy trial. *Blood* *105*, 2699-2706.
- Schnepf, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A., and Johnson, P. R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* *77*, 3495-3504.
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* *110*, 521-529.
- Schultz, B. R., and Chamberlain, J. S. (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* *16*, 1189-1199.
- Scott, W. G. (2007). Ribozymes. *Curr Opin Struct Biol* *17*, 280-286.
- Seeley, M., Huang, W., Chen, Z., Wolff, W. O., Lin, X., and Xu, X. (2007). Depletion of zebrafish titin reduces cardiac contractility by disrupting the assembly of Z-discs and A-bands. *Circ Res* *100*, 238-245.
- Sharp, P. A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* *77*, 805-815.
- Shin, K. S., Sullenger, B. A., and Lee, S. W. (2004). Ribozyme-mediated induction of apoptosis in human cancer cells by targeted repair of mutant p53 RNA. *Mol Ther* *10*, 365-372.
- Sierakowska, H., Sambade, M. J., Agrawal, S., and Kole, R. (1996). Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12840-12844.
- Skordis, L. A., Dunckley, M. G., Yue, B., Eperon, I. C., and Muntoni, F. (2003). Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4114-4119.
- Sleeper, M. M., Fornasari, B., Ellinwood, N. M., Weil, M. A., Melniczek, J., O'Malley, T. M., Sammarco, C. D., Xu, L., Ponder, K. P., and Haskins, M. E. (2004). Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII. *Circulation* *110*, 815-820.
- Sly, W. S., Brot, F. E., Glaser, J., Stahl, P. D., Quinton, B. A., Rimoin, D. L., and McAlister, W. H. (1974). Beta-glucuronidase deficiency mucopolysaccharidosis. *Birth Defects Orig Artic Ser* *10*, 239-245.
- Smih, F., Rouet, P., Romanienko, P. J., and Jasin, M. (1995). Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* *23*, 5012-5019.

- Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., *et al.* (2006). A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* 34, e149.
- Smith, R. H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15, 817-822.
- Stein, C. S., Kang, Y., Sauter, S. L., Townsend, K., Staber, P., Derksen, T. A., Martins, I., Qian, J., Davidson, B. L., and McCray, P. B., Jr. (2001). In vivo treatment of hemophilia A and mucopolysaccharidosis type VII using nonprimate lentiviral vectors. *Mol Ther* 3, 850-856.
- Stieger, K., Le Meur, G., Lasne, F., Weber, M., Deschamps, J. Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Martin, L., Moullier, P., and Rolling, F. (2006). Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 13, 967-975.
- Stieger, K., Mendes-Madeira, A., Meur, G. L., Weber, M., Deschamps, J. Y., Nivard, D., Provost, N., Moullier, P., and Rolling, F. (2007). Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 14, 1668-1673.
- Sun, H., and Chasin, L. A. (2000). Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol* 20, 6414-6425.
- Sun, L., Li, J., and Xiao, X. (2000). Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med* 6, 599-602.
- Suter, D., Tomasini, R., Reber, U., Gorman, L., Kole, R., and Schumperli, D. (1999). Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum Mol Genet* 8, 2415-2423.
- Sutton, R. E., and Boothroyd, J. C. (1986). Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47, 527-535.
- Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., Shimizu, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Mitani, K. (2008). Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13781-13786.
- Suzuki, M., Kasai, K., and Saeki, Y. (2006). Plasmid DNA sequences present in conventional herpes simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. *J Virol* 80, 3293-3300.
- Swanson, M. S., and Dreyfuss, G. (1988). RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *Embo J* 7, 3519-3529.
- Szcepek, M., Brondani, V., Buchel, J., Serrano, L., Segal, D. J., and Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 25, 786-793.

- Tahara, M., Pergolizzi, R. G., Kobayashi, H., Krause, A., Luettich, K., Lesser, M. L., and Crystal, R. G. (2004). Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat Med* *10*, 835-841.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* *4*, 346-358.
- Tilghman, S. M., Tiemeier, D. C., Seidman, J. G., Peterlin, B. M., Sullivan, M., Maizel, J. V., and Leder, P. (1978). Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 725-729.
- Tomatsu, S., Orii, K. O., Vogler, C., Grubb, J. H., Snella, E. M., Gutierrez, M. A., Dieter, T., Sukegawa, K., Orii, T., Kondo, N., and Sly, W. S. (2002). Missense models [Gustm(E536A)Sly, Gustm(E536Q)Sly, and Gustm(L175F)Sly] of murine mucopolysaccharidosis type VII produced by targeted mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14982-14987.
- Tonegawa, S., Maxam, A. M., Tizard, R., Bernard, O., and Gilbert, W. (1978). Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 1485-1489.
- Toromanoff, A., Adjali, O., Larcher, T., Hill, M., Guigand, L., Chenuaud, P., Deschamps, J., Gauthier, O., Blancho, G., Vanhove, B., *et al.* (2009). Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther En révision*.
- Tuszynski, M. H. (2002). Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* *1*, 51-57.
- Urayama, A., Grubb, J. H., Banks, W. A., and Sly, W. S. (2007). Epinephrine enhances lysosomal enzyme delivery across the blood brain barrier by up-regulation of the mannose 6-phosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12873-12878.
- Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D., and Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* *435*, 646-651.
- Vacek, M., Sazani, P., and Kole, R. (2003). Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell Mol Life Sci* *60*, 825-833.
- Valadkhan, S., and Manley, J. L. (2001). Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature* *413*, 701-707.
- Valadkhan, S., Mohammadi, A., Wachtel, C., and Manley, J. L. (2007). Protein-free spliceosomal snRNAs catalyze a reaction that resembles the first step of splicing. *Rna* *13*, 2300-2311.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

van Deutekom, J. C., Janson, A. A., Ginjaar, I. B., Frankhuizen, W. S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J. T., Koop, K., van der Kooi, A. J., Goemans, N. M., *et al.* (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357, 2677-2686.

Verma, I. M., and Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74, 711-738.

Vetrini, F., Tammara, R., Bondanza, S., Surace, E. M., Auricchio, A., De Luca, M., Ballabio, A., and Marigo, V. (2006). Aberrant splicing in the ocular albinism type 1 gene (OA1/GPR143) is corrected in vitro by morpholino antisense oligonucleotides. *Hum Mutat* 27, 420-426.

Vickers, T. A., Zhang, H., Graham, M. J., Lemonidis, K. M., Zhao, C., and Dean, N. M. (2006). Modification of MyD88 mRNA splicing and inhibition of IL-1beta signaling in cell culture and in mice with a 2'-O-methoxyethyl-modified oligonucleotide. *J Immunol* 176, 3652-3661.

Viles, K. D., and Sullenger, B. A. (2008). Proximity-dependent and proximity-independent trans-splicing in mammalian cells. *Rna* 14, 1081-1094.

Vitte, J., Fassier, C., Tiziano, F. D., Dalard, C., Soave, S., Roblot, N., Brahe, C., Saugier-veber, P., Bonnefont, J. P., and Melki, J. (2007). Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol* 171, 1269-1280.

Vogler, C., Birkenmeier, E. H., Sly, W. S., Levy, B., Pegors, C., Kyle, J. W., and Beamer, W. G. (1990). A murine model of mucopolysaccharidosis VII. Gross and microscopic findings in beta-glucuronidase-deficient mice. *Am J Pathol* 136, 207-217.

Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Lessard, M., Soper, B., and Barker, J. (2005a). Early onset of lysosomal storage disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII: undegraded substrate accumulates in many tissues in the fetus and very young MPS VII mouse. *Pediatr Dev Pathol* 8, 453-462.

Vogler, C., Levy, B., Grubb, J. H., Galvin, N., Tan, Y., Kakkis, E., Pavloff, N., and Sly, W. S. (2005b). Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14777-14782.

Vogler, C., Sands, M., Higgins, A., Levy, B., Grubb, J., Birkenmeier, E. H., and Sly, W. S. (1993). Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis type VII mouse. *Pediatr Res* 34, 837-840.

Vogler, C., Sands, M. S., Levy, B., Galvin, N., Birkenmeier, E. H., and Sly, W. S. (1996). Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in murine mucopolysaccharidosis type VII: impact of therapy during the first six weeks of life on subsequent lysosomal storage, growth, and survival. *Pediatr Res* 39, 1050-1054.

- Walls, Z. F., Puttaraju, M., Temple, G. F., and Gambhir, S. S. (2008). A generalizable strategy for imaging pre-mRNA levels in living subjects using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Nucl Med* 49, 1146-1154.
- Wang, B., Li, J., and Xiao, X. (2000). Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13714-13719.
- Wang, L., Dobrzynski, E., Schlachterman, A., Cao, O., and Herzog, R. W. (2005). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* 105, 4226-4234.
- Wang, Q., and Taylor, M. W. (1993). Correction of a deletion mutant by gene targeting with an adenovirus vector. *Mol Cell Biol* 13, 918-927.
- Wang, Z., and Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* 14, 802-813.
- Watchko, J., O'Day, T., Wang, B., Zhou, L., Tang, Y., Li, J., and Xiao, X. (2002). Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Hum Gene Ther* 13, 1451-1460.
- Weinstock, R., Sweet, R., Weiss, M., Cedar, H., and Axel, R. (1978). Intragenic DNA spacers interrupt the ovalbumin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1299-1303.
- Will, C. L., and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301.
- Wilton, S. D., and Fletcher, S. (2005). RNA splicing manipulation: strategies to modify gene expression for a variety of therapeutic outcomes. *Curr Gene Ther* 5, 467-483.
- Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D., and Kleinschmidt, J. A. (1997). Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71, 1341-1352.
- Wobus, C. E., Hugle-Dorr, B., Girod, A., Petersen, G., Hallek, M., and Kleinschmidt, J. A. (2000). Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol* 74, 9281-9293.
- Wolfe, J. H., Sands, M. S., Barker, J. E., Gwynn, B., Rowe, L. B., Vogler, C. A., and Birkenmeier, E. H. (1992). Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* 360, 749-753.
- Woloszynek, J. C., Coleman, T., Semenkovich, C. F., and Sands, M. S. (2007). Lysosomal dysfunction results in altered energy balance. *J Biol Chem* 282, 35765-35771.
- Woloszynek, J. C., Roberts, M., Coleman, T., Vogler, C., Sly, W., Semenkovich, C. F., and Sands, M. S. (2004). Numerous transcriptional alterations in liver persist after short-term enzyme-replacement therapy in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII. *Biochem J* 379, 461-469.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wong, A. W., He, S., Grubb, J. H., Sly, W. S., and Withers, S. G. (1998). Identification of Glu-540 as the catalytic nucleophile of human beta-glucuronidase using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem* 273, 34057-34062.
- Wood, M., Yin, H., and McClorey, G. (2007). Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* 3, e109.
- Wraith, J. E. (1995). The mucopolysaccharidoses: a clinical review and guide to management. *Arch Dis Child* 72, 263-267.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14, 316-327.
- Xu, L., Haskins, M. E., Melniczek, J. R., Gao, C., Weil, M. A., O'Malley, T. M., O'Donnell, P. A., Mazrier, H., Ellinwood, N. M., Zweigle, J., *et al.* (2002). Transduction of hepatocytes after neonatal delivery of a Moloney murine leukemia virus based retroviral vector results in long-term expression of beta-glucuronidase in mucopolysaccharidosis VII dogs. *Mol Ther* 5, 141-153.
- Yamada, Y., Kato, K., Sukegawa, K., Tomatsu, S., Fukuda, S., Emura, S., Kojima, S., Matsuyama, T., Sly, W. S., Kondo, N., and Orii, T. (1998). Treatment of MPS VII (Sly disease) by allogeneic BMT in a female with homozygous A619V mutation. *Bone Marrow Transplant* 21, 629-634.
- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D., and Engelhardt, J. F. (2000). Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6716-6721.
- Yang, Y., and Walsh, C. E. (2005). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol Ther* 12, 1006-1012.
- Ye, X., Rivera, V. M., Zoltick, P., Cerasoli, F., Jr., Schnell, M. A., Gao, G., Hughes, J. V., Gilman, M., and Wilson, J. M. (1999). Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 283, 88-91.
- Yee, J. K., Moores, J. C., Jolly, D. J., Wolff, J. A., Respass, J. G., and Friedmann, T. (1987). Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5197-5201.
- Yoon, J. W., and Jun, H. S. (2002). Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 8, 62-68.
- Young, P. J., DiDonato, C. J., Hu, D., Kothary, R., Androphy, E. J., and Lorson, C. L. (2002). SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum Mol Genet* 11, 577-587.
- Yu, S. F., von Ruden, T., Kantoff, P. W., Garber, C., Seiberg, M., Ruther, U., Anderson, W. F., Wagner, E. F., and Gilboa, E. (1986). Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3194-3198.

- Zaiss, A. K., and Muruve, D. A. (2005). Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 5, 323-331.
- Zaiss, A. K., and Muruve, D. A. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* 15, 808-816.
- Zayed, H., Xia, L., Yerich, A., Yant, S. R., Kay, M. A., Puttaraju, M., McGarrity, G. J., Wiest, D. L., McIvor, R. S., Tolar, J., and Blazar, B. R. (2007). Correction of DNA Protein Kinase Deficiency by Spliceosome-mediated RNA Trans-splicing and Sleeping Beauty Transposon Delivery. *Mol Ther* 15, 1273-1279.
- Zheng, Z. M. (2004). Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci* 11, 278-294.
- Zheng, Z. M., Huynen, M., and Baker, C. C. (1998). A pyrimidine-rich exonic splicing suppressor binds multiple RNA splicing factors and inhibits spliceosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14088-14093.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, 9873-9880.

ÉTUDE DU *TRANS*-ÉPISSAGE COMME OUTIL DE THÉRAPIE GÉNIQUE DANS LE MODÈLE CANIN DE LA MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE VII

Parmi les stratégies correctives en thérapie génique, le *trans*-épissage permet de remplacer, au niveau de l'ARN pré-messager, une séquence mutante par une séquence normale exogène portée par un « PTM » dans une réaction contrôlée par le spliceosome.

Dans cette étude, nous avons évalué la faisabilité du *trans*-épissage dans le modèle canin de la mucopolysaccharidose de type VII. Nous avons testé différents PTM, de même que différentes molécules adjuvantes, le snRNAU7 et les ARN bifonctionnels. Nos résultats montrent que dans un système minigène, le *trans*-épissage permet la reprogrammation de l'ARN pré-messager  $\beta$ -glucuronidase, détectable au niveau moléculaire comme au niveau protéique. Cependant, les choses sont beaucoup plus compliquées dans un environnement naturel. Les PTM sont ici capables d'interagir avec leur cible, mais l'efficacité de la réaction est le facteur limitant le plus critique. Ainsi, s'il a pu être possible de détecter des ARN messagers « *trans*-épissés », notamment en présence du snRNA U7 et des ARN bifonctionnels, nous n'avons jamais été en mesure de détecter de protéine issue de la réaction de *trans*-épissage dans cet environnement. Cette étude, ainsi que d'autres, pointent la difficulté de manipulation du *trans*-épissage dans les protocoles de thérapie génique.

*Mots Clés*: thérapie génique, stratégies correctives, ARN, épissage, *trans*-épissage, mucopolysaccharidose de type VII

STUDY OF *TRANS*-SPLICING AS THERAPEUTIC TOOL IN GENE THERAPY IN THE MUCOPOLYSACCHARIDOSIS VII MODEL

Among corrective strategies in gene therapy, *trans*-splicing allows the reprogramming, at the pre-messenger RNA level, of a mutant sequence by an exogenous and normal sequence carried by a « PTM » in a reaction controlled by the spliceosome.

In this study, we evaluated the feasibility of *trans*-splicing in the canine model of mucopolysaccharidosis VII. We tested different PTM and different adjuvant molecules, the U7 snRNA and the bifunctional RNA. Our results show that in an artificial minigene context, *trans*-splicing allows the reprogramming of the GusB transcript, as seen at the molecular and at the protein levels. However, things are more difficult in the natural context. In this environment, PTM are able to react with their target, but the efficiency is the major limiting factor. Thus, even if it was possible to detect *trans*-splicing resulting transcript, particularly in the presence of the U7 snRNA and of the bifunctional RNA, we could not detect *trans*-splicing resulting protein in this environment. This study, like others, points the difficulty to manipulate *trans*-splicing in the gene therapy protocols.

*Key words*: gene therapy, corrective strategies, RNA, splicing, *trans*-splicing, mucopolysaccharidosis VII