

Université de Nantes

Faculté de Médecine

OPTIMISATION DU TRANSFERT DE GÈNE DANS LA RÉTINE PAR VECTEUR VIRAL ADENO ASSOCIÉ.

THESE DE DOCTORAT

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Biologie-Médecine-Santé

Spécialité : Transfert de gène et thérapie génique

Présentée et soutenue publiquement par

BELBELLAA Brahim

Le 27 Janvier 2011, devant le Jury ci-dessous

Président du Jury :

Rapporteurs : **Dr. Mariesol Corral-Debrinski, Dr. Eric J. Kremer**

Examineurs : **Dr. Marie-Anne Colle, Pr. Nicolas Ferry**

Directrice de thèse : **Dr Fabienne Rolling**

Remerciements

À ma famille,

À mes amis,

Je remercie le docteur Philippe Moullier, directeur de l'Unité INSERM U649, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je remercie Fabienne Rolland, pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse, pour la patience et la confiance qu'elle m'a accordées, mais surtout pour m'avoir enseigné la rigueur scientifique.

Je remercie le Dr. Marisol Corral-Debrinski, et le Dr. Eric J. Kremer, le Dr. Marie-Anne Collé et le Pr. Nicolas Ferry d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe rétine avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler au cours de ces 3 années : Knut Stieger, Elsa Mougenot-Lhériveau, Christine Chauveau, Alexandra Mendes-Madeira, Nathalie Provost, Lyse Libeau, Caroline Guihal, Delphine Nivard, Guylène Le Meur, Lolita Monnier, Jack Yves Deschamps, et Michel Weber.

Je remercie tout particulièrement Knut Stieger pour son accueil, son soutien et son aide crucial au cours des premiers mois de ma thèse. Je souhaite aussi remercier tout particulièrement Elsa Mougenot-Lhériveau, Caroline Le Guiner, Béatrice Joussemet, Oumeya Adjali et Adrien Leger pour leurs conseils et leur aide pendant la rédaction de ce manuscrit, et plus généralement pendant ma thèse.

Je remercie aussi chaleureusement Laurence Dubreil, Mireille Ledevin, et Yan Cherel pour leur collaboration inestimable et très enrichissante à de nombreuses reprises au cours de ma thèse.

Je remercie Anita Champion pour sa disponibilité et son aide précieuse.

Je remercie également tout le personnel du centre de Boisbonne, passé et présent, pour leur disponibilité, leur dévouement, et leur savoir-faire.

Je remercie la plateforme de production de vecteur préclinique du laboratoire (LAV), pour leur bonne humeur, ainsi que pour leur rapidité et leur efficacité à produire tous les vecteurs AAV recombinants qui ont été utilisés au cours de mes travaux de thèse.

Merci également à...

À Sylvain Sachot pour les « pauses terrasse » du bâtiment Jean Monnet.

À Véronique Blouin pour ses discussions enrichissantes sur l'AAV et ses nombreux conseils en culture cellulaire.

Mais aussi à Mickäel, à Thomas, à Gwladys, à Béatrice, à Magalie, à Aurélie, à Alice pour tous les moments sympas passés ensemble

À tous les membres du laboratoire pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

Abréviations

67LR	récepteur de la laminine 37/67-KDa	BHR	barrière hémato-rétinienne
γ RV	gamma rétrovirus	BHRe	BHR externe
AAV	virus adéno-associé	BHRi	BHR interne
AAVr	vecteur viral AAV recombinant	Ca ²⁺	ion calcium
ABCA4	ATP-binding cassette 4	[Ca ²⁺]	concentration en Ca ²⁺
AC1	adénylate cyclase 1	CAG	promoteur CMV early enhancer/chicken β actin promotor
ACAID	anterior chamber associated immune deviation	CBA	chicken beta actin
ACL	amaurose congénitale de Leber	CBB	cellule bipolaire à bâtonnets
Ad	adénovirus	CBC	cellule bipolaire à cônes
AND	acide désoxyribonucléique	CD	cône dystrophie
ADNc	ADN complémentaire	CG	couche des cellules ganglionnaires
AIPL1	Aryl hydrocarbon interacting protein-like 1	CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
AMP	adénosine monophosphate	CMV	promoteur recombinant cytomégalovirus
AMPc	AMP cyclique	CMV MIEP	CMV major immediate early promoter
[AMPc]	concentration en AMPc	CNE	couche nucléaire externe
ARN	acide ribonucléique	CNI	couche nucléaire interne
ARNi	ARN interférentiel	CPA/APC	cellule présentatrice d'antigène
ARNm	ARN messager	CPE	couche plexiforme externe
ARNt	ARN de transfert	CPI	couche plexiforme interne
ATF	Activating Transcription Factor	CRD	cône-rod dystrophie
ATP	adénosine triphosphate	CRE	cAMP responding element
ATRA	all-trans-rétinal	CREB	CRE binding protein
BBS	syndrome de Bardet Biedl	CSH	cellule souche hématopoïétique
BGH	hormone de croissance bovine	Da	dalton
BHM	barrière hémato-méningée		

Abréviations

DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole	HLA	antigène leucocyte humain
dGFP	eGFP déstabilisée	HSV1	herpès simplex virus 1
DHR	dégénérescence héréditaire de la rétine	IDUA	α -L-iduronidase
DHR AD	DHR à transmission autosomique dominante	IFN1	interféron 1
DHR AR	DHR à transmission autosomique récessive	IFN γ	interféron gamma
eGFP	enhanced green fluorescent protein	IL-2, 10...	interleukine 2, 10....
EGFR	récepteur du facteur de croissance épidermique	ITR	séquence terminale inversée et répétée
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay	JSRD	syndrome de Joubert et les pathologies associées
EPO	érythropoïétine	LB	lymphocyte B
[EPO]	concentration intraoculaire en EPO	L/L	cycle lumière/lumière
EPR	épithélium pigmentaire rétinien	L/O	cycle lumière/obscurité
ERG	électrorétinogramme	LT	lymphocyte T
FIX	facteur de coagulation 9	LTR	séquence terminale répétée
FGF2	facteur de croissance dérivé des fibroblastes	LTV	lentivirus
G6P	Glucose 6 phosphatase	miARN	micro ARN
GABA	acide γ -aminobutyrique	MIP	matrice inter-photorécepteurs
GMP	guanosine monophosphate	MLE	membrane limitante externe
GMPc	GMP cyclique	MLI	membrane limitante interne
[GMPc]	concentration en GMPc	MODC	murine ornithine décarboxylase
GUCY2D	sous-unité 2D de la guanylate cyclase	MOI	multiplicité d'infection
HAd	adénovirus humain	MPS	mucopolysaccharidose
HIV	virus de l'immunodéficience humaine	MSL	maladie de surcharge lysosomale
		Na ⁺	ion sodium
		OCT	ornithine carbamyl transférase
		pb/Kb	paires de bases/kilo bases

Abréviations

PCA	ponction de chambre antérieure	SI	segment interne
PDE6	phosphodiésterase 6	SNC	système nerveux central
PKA	protéine kinase A	ssAAV	AAV simple brin
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc	scAAV	AAV double brin
PN1	1 jour post-natal	SV40	virus simien 40
PolyA	séquence de polyadénylation	TLR	récepteur toll-like
PRPF31	pre-mRNA processing factor 31 homolog	TPP1	tripeptidylpeptidase I
OA1	gène « ocular albinism type 1 »	UTR	untranslated region
rAd	vecteur viral Ad recombinant	VDM2	gène Bestrophine
RCD	rod cone dystrophie	vg	vecteur génome
RDH12	rétinol déhydrogenase 12	vg/c	vecteur génome par cellule
rHAd	vecteur viral Had recombinant	WPRE	woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulator Element
rHSV1	vecteur viral HSV1 recombinant		
rHSV1 RC	vecteur rHSV1 compétent pour la réplication		
rHSV1 RD	vecteur rHSV1 déficient pour la réplication		
RHO	rhodopsine		
RK	rhodopsine kinase		
RP	rétinite pigmentaire		
RP1	gène « retinitis pigmentosa 1 »		
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein		
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase regulator		
RS1	gène retinoschisine		
SE	segment externe		

ILLUSTRATIONS

Figure 1. Structure schématique de l'œil humain en coupe sagittale.	15
Figure 2. Structure de la rétine en coupe transversale.	18
Figure 3. Schéma de la choroïde en coupe transversale	19
Figure 4. Schéma du cycle des rétinoïdes.	23
Figure 5. Schéma de la structure d'un photorécepteur de type bâtonnet.	25
Figure 6. Schéma de la cascade de phototransduction dans les photorécepteurs de type « bâtonnet »	27
Figure 7. Schéma de la vascularisation choroïdienne et intra-rétinienne dans l'œil.	33
Figure 8. Modèle mécanistique de la réponse immune déviée associée à la chambre antérieure (ACAID) de l'œil.	36
Figure 9. Liste des gènes identifiés comme responsables de rétinites pigmentaires (RP) et leur fréquence relative selon leur mode de transmission héréditaire.	38
Figure 10. Liste des gènes identifiés comme responsables de rétinites pigmentaires (RP) selon la fonction cellulaire des protéines codées.	39-40
Figure 11. Liste des maladies métaboliques héréditaires lysosomales et leur fréquence.	48
Figure 12. Atteintes oculaires dans les mucopolysaccharidoses.	49
Figure 13. Schéma illustrant les stratégies de thérapie génique <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> .	52
Figure 14. Représentation de la capsidie et du génome du virus adéno-associé sauvage (AAV)	56
Figure 15. Liste des 12 vecteurs adéno-associés d'origine humaine et simienne, clonés et caractérisés à ce jour, et les récepteurs cellulaires de surface permettant leur adhésion cellulaire	57
Figure 16. Schéma du mécanisme d'entrée cellulaire du virus adéno-associé (AAV), et de son transport intracellulaire vers le noyau cellulaire.	58
Figure 17. Schéma de l'organisation génomique des AAV sauvages et des vecteurs AAV recombinants.	61
Figure 18. Liste des principaux organes ciblés en transfert de gène thérapeutique et des sérotypes permettant leur transduction efficace.	62
Figure 19. Les essais cliniques de thérapie génique réalisés dans le monde entre 1989 et 2010, en fonction du type de vecteur utilisé et de l'application thérapeutique.	65
Figure 20. Liste des essais cliniques de thérapie génique réalisé à l'aide des vecteurs recombinants adéno-associé autorisés par la FDA et réalisés aux USA jusqu'en 2008.	66
Figure 21. Représentation schématique de la capsidie et du génome de l'adénovirus sauvage	69
Figure 22. Représentation schématique de la capsidie et du génome des rétrovirus sauvage	72
Figure 23. Représentation schématique de la capsidie et du génome de l'herpès simplex virus.	77
Figure 24. Tropisme des principaux vecteurs AAVr dans la rétine après administration sous-rétinienne	80
Figure 25. Tropisme des principaux vecteurs AAVr dans la rétine après administration intra-vitréenne	81
Figure 26. Schéma du promoteur sauvage du gène Immediate Early 1 du virus cytomégalo virus humain (CMV MIEP) et de ses sites de liaison aux facteurs de transcriptions eucaryote.	88
Figure 27. Schéma de l'activation du facteur de transcription CREB par la voie de signalisation AMPc/PKA.	89-90

Figure S1. Observation <i>in vivo</i> de l'expression oculaire des vecteurs scAAV2/1.gfp et AAV2/6.gfp, 2 mois après administration intraveineuse chez le rat nouveau-né.	122
Figure S2. Mise en évidence <i>in vivo</i> de la transduction oculaire bilatérale chez les rats injectés par voie intraveineuse à la naissance avec le vecteur scAAV2/9.gfp.	123
Figure S3. Schéma de la rétine et de la choroïde illustrant le caractère polarisé des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.	127
Figure S4. Observation <i>in vivo</i> de l'expression oculaire des vecteurs scAAV2/8.gfp et AAV2/9.gfp, 2 mois après administration intraveineuse chez le rat adulte.	129
Figure S5. Mise en évidence <i>in vivo</i> de la transduction oculaire bilatérale chez les chiens injectés par voie intraveineuse à la naissance ou à l'âge adulte avec le vecteur scAAV2/9.gfp	133
Figure S6. Observation <i>in vivo</i> de l'expression oculaire du vecteurs scAAV2/9.gfp à 3 mois post-injection chez le chat nouveau-né et adulte.	134
Figure S7. Schéma de la structure de la choroïde chez le chien, dans la zone tapétale et la zone non-tapétale du segment postérieur de l'œil.	135
Figure S8. Observation au microscope à fluorescence de coupes transversales de rétine de chat injecté à 1 jour après la naissance avec le vecteur scAAV2/9.gfp, et observé à 3 mois post-injection.	136
Figure S9. Observation au microscope à fluorescence de coupes transversales de rétine de chat injecté à PN60 jour avec le vecteur scAAV2/9.gfp, et observé à 3 mois post-injection.	139
Figure 28. Schéma des voies de signalisation associées à la cascade de phototransduction, et de leur régulation par la lumière et l'obscurité dans les photorécepteurs.	152-153
Figure 29. Schéma des vecteurs AAV recombinants (AAVr).	158
Tableau 1 : Agents pharmacologiques ciblant la cascade de phototransduction, et les voies de signalisation associées.	163
Figure 30. Observation <i>in vivo</i> de l'expression des vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.eGFP dans la rétine de rats, après exposition successive aux conditions d'éclairage L/O et L/L.	166
Figure 31. Observation <i>in vivo</i> de l'expression des vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP dans la rétine de rats, après exposition alternée aux conditions d'éclairage L/O et L/L.	167
Figure 32. Observation au microscope à fluorescence de coupes transversales de rétine de rats injectés avec les vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP, après exposition aux conditions de lumière L/O ou LL.	170
Figure 33. Observation <i>in vivo</i> de l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.dGFP dans la rétine, après une exposition courte aux conditions d'éclairage L/O et L/L.	171
Figure 34. Observation <i>in vivo</i> de l'expression des vecteurs AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP dans la rétine de rats après expositions prolongée aux conditions d'éclairage L/O et L/L.	173
Figure 35. Concentration intraoculaire moyenne en érythropoïétine ([EPO]) chez les rats injectés avec le vecteur AAV2/5.CMV.EPO, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L.	176
Figure 36. L'administration intraoculaire de zaprinast restaure l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine, en condition de lumière L/L.	180-181
Figure 37. Proposition d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle du promoteur CMV, par la lumière et par l'obscurité dans les photorécepteurs.	186

SOMMAIRE

Abréviations	1
Illustrations	4
Sommaire	6
Préambule	11
Introduction	14
1. <u>Anatomie, Physiologie et Pathologies de l'œil et de la rétine</u>	14
1.1. Anatomie et physiologie de l'œil	14
1.1.1. Le segment antérieur	14
1.1.2. Le segment postérieur	16
1.2. Anatomie et physiologie de la rétine	20
1.2.1. L'organisation histologique de la rétine	20
1.2.2. L'organisation fonctionnelle de la rétine	21
1.2.2.1. L'épithélium pigmentaire rétinien	22
1.2.2.2. La neurorétine	24
1.2.2.2.1. Les photorécepteurs	24
1.2.2.2.1.1. Les photorécepteurs de types bâtonnets et cônes	26
1.2.2.2.1.2. La cascade de phototransduction	26
1.2.2.2.2. Les cellules horizontales	28
1.2.2.2.3. Les cellules bipolaires	28
1.2.2.2.4. Les cellules amacrines	29
1.2.2.2.5. Les cellules ganglionnaires	29
1.2.2.2.6. Les cellules gliales de la rétine	30
1.2.2.2.6.1. Les cellules de Müller	30
1.2.2.2.6.2. Les cellules microgliales	30
1.2.2.2.6.3. Les astrocytes	30
1.3. La barrière hémato-rétinienne et le privilège immunologique de l'œil	31
1.3.1. La vascularisation de l'œil	31
1.3.2. La barrière hémato-rétinienne	32
1.3.3. Le privilège immunologique de l'œil	34
1.4. Les dégénérescences héréditaires de la rétine syndromiques et non syndromiques	37
1.4.1. Les dégénérescences héréditaire non-syndromiques de la rétine : physiopathologie et classification clinique	41

1.4.2. Les dégénérescences héréditaires syndromiques de la rétine	44
1.4.2.1. Les ciliopathies héréditaires syndromiques	45
1.4.2.2. Les maladies métaboliques héréditaires	46
2. <u>Le transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs viraux recombinants</u>	50
2.1. Généralités à propos de la thérapie génique	50
2.2. Les vecteurs viraux recombinants	54
2.2.1. Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés	54
2.2.1.1. Les virus adéno-associés sauvages	54
2.2.1.2. Les vecteurs viraux recombinants adéno-associés	59
2.2.2. Les vecteurs dérivés des virus adénovirus	67
2.2.2.1. Les virus adénovirus sauvages	67
2.2.2.2. les vecteurs viraux recombinants des Adénovirus	67
2.2.3. Les vecteurs dérivés des rétrovirus	71
2.2.3.1. Les rétrovirus sauvages	71
2.2.3.2. Les vecteurs viraux recombinants gammarétrovirus et des lentivirus	73
2.2.4. Les vecteurs dérivés des herpès simplex virus	75
2.2.4.1. Les herpes virus sauvages	75
2.2.4.2. les vecteurs viraux recombinants dérivés de l'herpès simplex virus 1	75
2.2.5. Les vecteurs viraux AAVr comme vecteurs de choix pour le transfert de gène dans la rétine	78
2.2.5.1.1. Le tropisme oculaire	78
2.2.5.1.2. L'innocuité des vecteurs AAVr dans la rétine	82
2.3. L'optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs AAVr	83
2.3.1. L'optimisation des vecteurs AAVr	83
2.3.1.1. Les vecteurs scAAV double brin	83
2.3.1.2. Les modifications de la capsid des vecteurs AAVr	84
2.3.2. L'optimisation de la cassette d'expression	86
2.3.2.1. L'optimisation de la transcription	86
2.3.2.1.1. Les promoteurs	86
2.3.2.1.1.1. Les promoteurs ubiquitaires	86
2.3.2.1.1.1.1. Les promoteurs ubiquitaires d'origine eucaryote	86
2.3.2.1.1.1.2. Les promoteurs ubiquitaires d'origine virale	87
2.3.2.1.1.2. Les promoteurs spécifiques de la rétine	91
2.3.2.1.1.3. Les systèmes de régulation d'expression inductibles	93

2.3.2.2.	La stabilité des ARNm recombinants et leur traduction en protéine	93
2.3.2.3.	La stabilité des protéines recombinantes	96
2.4.	<i>L'optimisation du protocole d'administration des vecteurs AAVr dans la rétine</i>	96
2.4.1.	L'optimisation du mode d'administration intra-vitréen des AAVr	97
2.4.2.	L'optimisation du mode d'administration sous-rétinien des AAVr	98
3.	<u>Thérapie génique pour le traitement des dégénérescences héréditaires de la rétine</u>	100
3.1.	<i>Le traitement des DHR non syndromiques</i>	100
3.1.1.	Le traitement des DHR non syndromiques à transmission autosomique récessive	100
3.1.2.	Le traitement des DHR non syndromiques à transmission autosomique dominante	103
3.2.	<i>Le traitement des DHR syndromiques</i>	106
3.2.1.	Le traitement des mucopolysaccharidoses	106
3.2.2.	Le traitement de la maladie de Batten	110
4.	<u>Optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs AAVr</u>	113
4.1.	Optimisation du protocole d'administration des vecteurs AAVr.	113
4.2.	Évaluation de la stabilité de l'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents promoteurs, dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.	114
	Résultats	116
1.	1^{ère} étude « Systemic delivery of scAAV9 in newborn rats and dogs results in gene transfer to rpe cells in the retina »	117
	Résultats et Discussion de la 1^{ère} étude	118
1.1	Introduction	118
1.1.1	Objectif de l'étude	120
1.2	Résultats et Discussion	121
1.2.1	Évaluation du tropisme oculaire des différents sérotypes de vecteur scAAV.CMV.eGFP chez le rat nouveau-né, après administration intraveineuse	121
1.2.2	Évaluation du tropisme oculaire des sérotypes scAAV2/8 et scAAV2/9 chez le rat adulte, après administration intraveineuse	128
1.2.3	Évaluation du tropisme oculaire du vecteur scAAV2/9 chez le chien nouveau-né et le chien adulte, après administration intraveineuse	131
1.2.4	Évaluation de la réponse immune chez le chien après administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.	140
1.3	Conclusion et perspectives	144

2.	2eme étude : Effet de l'exposition à la lumière sur l'expression dans la rétine, d'un transgène sous le contrôle du promoteur CMV, après transfert de gène par vecteur AAV recombinant.	148
2.1.	Introduction	149
2.1.1.	Objectifs de l'étude et stratégies expérimentales	154
2.2.	Matériels et Méthodes	156
2.2.1.	Construction des plasmides recombinants	156
2.2.2.	Production des vecteurs AAV recombinants	156
2.2.3.	Injection sous-rétinienne des vecteurs AAVr	159
2.2.4.	Protocole d'exposition à la lumière	160
2.2.5.	Observation <i>in vivo</i> de l'expression des transgènes eGFP et dGFP	160
2.2.6.	Observation au microscope à fluorescence des rétines	161
2.2.7.	Dosage de la concentration intraoculaire en érythropoïétine	161
2.2.8.	Préparation des agents pharmacologiques et évaluation de leur toxicité	161
2.2.9.	Analyses statistiques	164
2.3.	Résultats	164
2.3.1.	Évaluation de l'expression des transgènes eGFP et dGFP sous le contrôle du promoteur CMV, dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, en fonction des conditions de lumière	164
2.3.1.1.	Évaluation de l'effet de la lumière dans les cellules de l'EPR	164
2.3.1.2.	Évaluation de l'effet de la lumière dans les photorécepteurs	168
2.3.2.	Évaluation de l'expression dans les photorécepteurs de la dGFP sous le contrôle des promoteurs rhodopsine et rhodopsine kinase, en fonction des conditions de lumière	172
2.3.3.	Quantification de la concentration intraoculaire en érythropoïétine en fonction des conditions de lumière.	174
2.3.4.	Évaluation de la toxicité oculaire des agents pharmacologiques ciblant la cascade de phototransduction, et les voies de signalisation associées	177
2.3.5.	Évaluation de l'effet de l'administration intraoculaire de zaprinast sur l'effet répresseur de la lumière dans la rétine	179
2.4.	Discussion	183
2.4.1.	Bilan des résultats expérimentaux	183
2.4.2.	Les mécanismes cellulaires potentiellement responsables de l'effet répresseur de la lumière dans les photorécepteurs.	183
2.4.3.	Les conséquences potentielles de ce phénomène sur la thérapie génique dans l'œil	187
2.4.4.	Discussion relative à d'autres facteurs pouvant influencer négativement l'expression d'un transgène dans les photorécepteurs.	192
2.5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	192

Conclusion générale	193
Références bibliographiques	197
Annexe 1: « Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. »	222
Annexe 2: « In vivo Gene Regulation Using Tetracycline- Regulatable Systems. »	223

PREAMBULE

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés sous la direction du Docteur Fabienne Rolling, dans le Laboratoire de Thérapie Génique INSERM UMR 649, qui est dirigé par le Docteur Philippe Moullier.

L'UMR 649 a pour but la mise au point de protocoles de thérapie génique pour les maladies génétiques orphelines affectant la vision, ainsi que les fonctions motrices et cognitives. La thérapie génique consiste en l'utilisation de gènes médicaments pour corriger les dysfonctionnements cellulaires à l'origine de ces maladies, et idéalement restaurer complètement les fonctions physiologiques affectées chez les patients. Afin de transporter ces gènes médicaments dans les cellules malades des patients, les chercheurs de l'UMR 649 utilisent des vecteurs viraux recombinants, c'est-à-dire des virus produits en laboratoire, porteurs de gènes médicaments, mais qui sont désarmés de leur pouvoir pathogène naturel. L'objectif final est de transposer en clinique ces protocoles de thérapie génique après avoir validé expérimentalement leur efficacité et leur innocuité dans différents modèles animaux.

L'équipe de recherche dirigée par le Dr. Rolling, s'intéresse au traitement des maladies héréditaires de la rétine qui induisent des cécités totales ou partielles, et en particulier aux rétinites pigmentaires (RP). Celles-ci affectent environ 1 individu sur 4000 (Berson, 1993; Hartong et al., 2006), et induisent la dégénérescence de la rétine qui est le tissu sensoriel au centre de la fonction visuelle. D'une part, nous évaluons le phénotype de nouveaux modèles animaux qui sont porteurs de mutations sur des gènes homologues à ceux impliqués dans les RP humaines. Ceci est réalisé à l'aide de différentes approches moléculaires, histologiques, ophtalmologiques, et comportementales. D'autre part, nous évaluons différentes stratégies d'optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide de nouveaux vecteurs viraux dérivant des virus adéno-associés (AAVr). Finalement, nous déterminons l'efficacité et l'innocuité de ces différentes stratégies pour le traitement des RP, dans des modèles petits et gros animaux.

Les AAVr constituent le vecteur de choix pour la thérapie génique dans de nombreux tissus, dont la rétine. Les vecteurs AAVr dérivent de virus non pathogènes dont la biologie est relativement bien connue. Ils sont capables de transduire, une grande variété de types cellulaires. De plus, ceux-ci n'induisent pas ou peu de toxicité *in vivo*, tout en permettant une expression stable et à long terme du transgène. En outre, la découverte de nouveaux sérotypes d'AAVr et leur évaluation *in vivo* dans la rétine ont mis en évidence leur capacité à cibler spécifiquement un ou plusieurs types cellulaires rétiniens. Récemment, plusieurs laboratoires ont montré en clinique humaine, l'innocuité et le

bénéfice thérapeutique de telles approches pour le traitement de la RP associée à la mutation RPE65 (MacLaren, 2009). De ce fait, les vecteurs AAVr ont émergé depuis deux décennies comme des outils de choix pour le traitement des pathologies rétinienne d'origine génétique.

Cependant, le succès de ces stratégies dépend de façon cruciale de leur capacité à induire un niveau d'expression adéquat du transgène thérapeutique, dans l'ensemble des tissus et cellules affectés. Ce paramètre a été montré comme crucial au cours de nombreuses études de thérapie génique conduites en particulier chez le petit et le gros animal, ainsi que chez l'humain. Or, le niveau d'expression du transgène dans les cellules ciblées est conditionné par 2 facteurs : **(1)** la capacité des vecteurs viraux tel que l'AAVr à transduire les cellules ciblées, c'est-à-dire à y entrer pour transporter le transgène thérapeutique dans leur noyaux, et **(2)** la capacité de la cassette d'expression portant le transgène thérapeutique à induire son expression de façon stable et à un niveau suffisant pour avoir un effet thérapeutique.

Il semble crucial, afin d'améliorer l'effet thérapeutique des protocoles actuels de thérapie génique, d'optimiser ces protocoles sur plusieurs points. **(1)** Le mode d'administration des vecteurs AAVr, afin de favoriser la distribution du vecteur dans tous les tissus d'intérêt. **(2)** La spécificité du tropisme des AAVr, pour limiter sa biodispersion et restreindre la transduction aux seules cellules d'intérêt. **(3)** L'efficacité des vecteurs AAVr à transduire les cellules d'intérêt, éventuellement à l'aide de nouveaux sérotypes d'AAVr plus performants. **(4)** L'optimisation de l'efficacité des cassettes d'expression, et en particulier de leur promoteur qui conditionne l'expression du transgène thérapeutique.

Le travail de cette thèse a porté sur l'étude et l'optimisation du transfert de gène dans la rétine, à l'aide de vecteurs AAV recombinants. Nous nous sommes particulièrement intéressés au transfert de gène dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et dans les photorécepteurs. Ces 2 types cellulaires forment dans la rétine une unité fonctionnelle indissociable, qui est impliquée dans la détection de la lumière et sa conversion en message nerveux. Les cellules de l'EPR et les photorécepteurs sont la cible de nombreuses pathologies dégénératives, entre autres d'origine génétiques, et représentent donc des cibles importantes pour le développement de nouvelles approches thérapeutique, et en particulier par transfert de gène *in vivo*.

D'une part, nous avons évalué un nouveau mode d'administration *in vivo* des vecteurs AAVr afin de transduire la rétine, et en particulier les cellules de l'EPR et les photorécepteurs. Ce mode d'administration se distingue par l'injection intraveineuse des vecteurs AAVr, à l'inverse des modes d'injection traditionnels qui consistent à injecter ces vecteurs localement et directement dans l'œil. L'objectif de cette étude est d'évaluer pour différents sérotypes de vecteurs AAVr double brin, leur

capacité et leur efficacité à transduire la rétine après administration intraveineuse, que ce soit à la naissance ou à l'âge adulte, et dans différents modèles petits et gros animaux. Nous avons évalué l'efficacité de ce transfert de gène à plusieurs niveaux : (1) la capacité à transduire la rétine dans les 2 yeux simultanément après une seule injection intraveineuse, (2) la capacité à transduire les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, et (3) la capacité à transduire la rétine de façon étendue, c'est-à-dire sur une grande partie de sa surface totale. Nous avons comparé l'efficacité de ces différents sérotypes chez le rat, le chien et le chat, afin de prendre en compte les variations de tropisme découlant des variations anatomiques et développementales inter-espèces. Cette approche nous semble particulièrement intéressante, car elle permettrait, après une seule injection intraveineuse, de réaliser un transfert de gène thérapeutique dans différents organes simultanément (rétine, système nerveux centrale, muscles, cœur...), qui sont affectés par de nombreuses maladies génétiques dégénératives syndromiques (maladies métaboliques...).

D'autre part, nous avons étudié l'influence de la lumière environnementale sur l'expression de plusieurs gènes rapporteurs dans la rétine, après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAVr simple brin (ssAAV). La pertinence de cette étude réside dans le fait que le succès des stratégies de thérapie génique, que ce soit dans la rétine ou dans d'autre organe, est conditionnée par l'expression stable du transgène thérapeutique dans les cellules ciblées, et à un niveau ni trop faible, pour permettre un effet thérapeutique, ni trop fort, pour éviter une éventuelle toxicité. Or, l'activité physiologique et transcriptionnelle des photorécepteurs et des cellules de l'EPR a été montrée comme fortement régulée par les variations de la lumière environnementale, *via* l'activation et l'inactivation de la cascade de phototransduction et des voies de signalisation cellulaires associées. Dans notre étude, nous avons évalué l'impact d'une exposition prolongée à la lumière, sur l'expression de ces gènes rapporteurs dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, lorsque ces transgènes sont sous le contrôle de différents promoteurs. Notre étude s'est focalisée sur 3 promoteurs recombinants utilisés couramment en transfert de gène dans la rétine : le promoteur recombinant CMV (cytomégalovirus), qui est ubiquitaire et d'origine virale, et les promoteurs rhodopsine et rhodopsine kinase qui sont tissu spécifique et d'origine mammifère. Cette étude a porté plus particulièrement sur le promoteur CMV dont l'activation et l'inactivation ont été décrites dans d'autres contextes expérimentaux, comme régulées par des voies de signalisation cellulaires similaires ou identiques à celles modulées par la lumière dans les photorécepteurs.

INTRODUCTION

L'introduction de ce manuscrit a pour objectif de présenter les avancées et les limites du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs viraux, et plus particulièrement des vecteurs AAVr. Ces vecteurs seront principalement présentés dans le contexte de la thérapie génique et des maladies dégénératives héréditaires de la rétine. De ce fait, l'introduction est découpée en trois parties. **(1)** La présentation de la physiologie de l'œil et de la rétine, ainsi que des principales pathologies génétiques responsables des dégénérescences de la rétine qui pourraient bénéficier de la thérapie génique. **(2)** Une présentation générale de la thérapie génique, ainsi qu'une description des principaux vecteurs viraux utilisés pour réaliser le transfert de gène dans la rétine. Les principales stratégies expérimentales d'optimisation de ce transfert de gène seront ensuite abordées. **(3)** Une présentation des principales études de thérapies géniques portant sur les maladies dégénératives de la rétine, qu'elles soient restreintes à la rétine et donc de type non-syndromique, ou qu'elles affectent d'autres organes en parallèle et donc de type syndromique.

1. Anatomie, physiologie et pathologies de l'œil et de la rétine

1.1. Anatomie et physiologie de l'œil

L'œil est l'organe spécialisé dans la détection de la lumière. Il est au centre de la fonction visuelle. Son organisation fonctionnelle et histologique est très conservée parmi les mammifères (**figure 1**).

L'œil est enveloppé par deux tuniques. La sclère lui donne sa couleur blanche et sa rigidité. L'uvée est le manteau intermédiaire qui contient entre autres la choroïde. Intérieurement, l'œil s'organise anatomiquement en 2 compartiments délimités par le cristallin. Le segment antérieur de l'œil a pour rôle de guider et de réguler l'entrée de la lumière dans l'œil. Le segment postérieur, quant à lui, a pour rôle de détecter les photons et de les convertir en message nerveux pour qu'ils soient adressés au cerveau.

1.1.1. Le segment antérieur

La cornée est un tissu conjonctif transparent. Elle délimite la partie antérieure de l'œil et constitue le premier élément réfractif de l'œil.

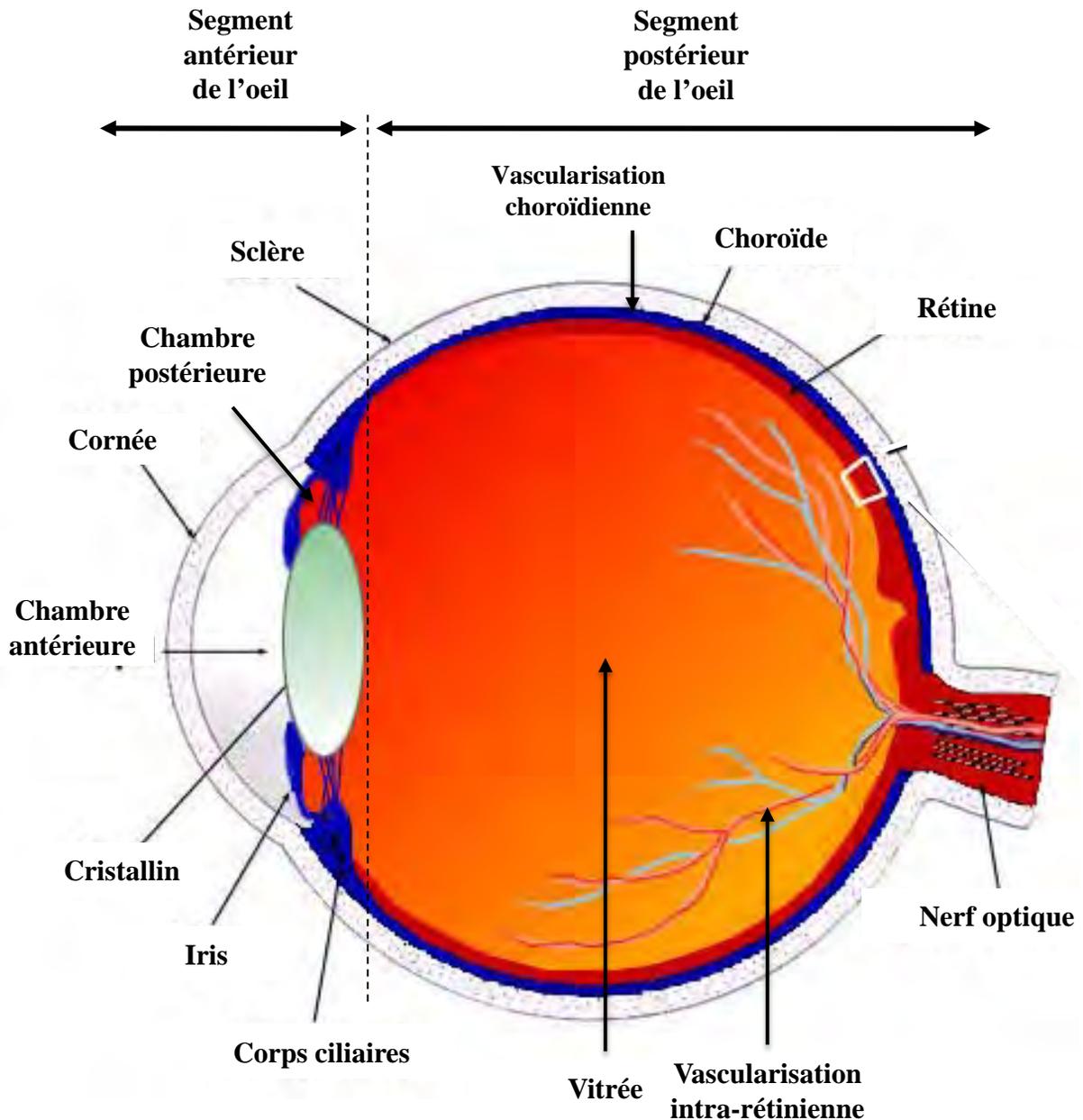


Figure 1. Structure schématique de l'œil humain en coupe sagittale.

L'œil est l'organe sensoriel central dans la fonction visuelle. Il est composé de structures optiquement actives, la cornée et le cristallin, qui permettent la convergence des rayons lumineux sur la rétine.

La rétine est un tissu très fin, plaqué sur la face interne et postérieure de l'œil. La rétine permet la conversion de l'information lumineuse en signaux électriques. Ces signaux électriques sont ensuite transportés vers le tractus optique, via le nerf optique.

L'œil est composé de plusieurs compartiments liquidiens. La chambre antérieure est un compartiment contenant l'humeur aqueuse. La chambre antérieure est délimitée en avant par la cornée, et en arrière par l'iris. La chambre postérieure contient aussi l'humeur aqueuse, et elle est délimitée par l'iris en avant et par le cristallin en arrière. Le vitré est localisé dans le segment postérieur de l'œil, et occupe la majorité du volume de l'œil.

La vascularisation de l'œil et de la rétine est assurée par deux réseaux vasculaires : la vascularisation intra-rétinienne et la vascularisation choroïdienne.

Illustrations issues de Webvision, Université de l'Utah aux USA (<http://webvision.med.utah.edu/>).

L'iris est un diaphragme pigmenté, il est composé de cellules épithéliales et de fibres musculaires lisses. L'iris est perforé centralement par la pupille dont l'ouverture varie pour moduler la quantité de lumière qui pénètre dans l'œil.

Le cristallin est une lentille biconvexe. Les muscles ciliaires permettent sa déformation et donc de faire varier sa force de convergence.

Les corps ciliaires sont une extension de la choroïde, et forment un tissu circonférentiel en arrière de l'iris. Ils sont composés des muscles ciliaires et des processus qui sécrètent l'humeur aqueuse dans l'œil.

La chambre antérieure de l'œil correspond à l'espace situé entre la cornée et l'iris.

La chambre postérieure de l'œil correspond à l'espace entre l'iris et le cristallin.

Les chambres antérieures et postérieures de l'œil sont remplies par l'humeur aqueuse. Celle-ci est sécrétée par les corps ciliaires. L'humeur aqueuse est résorbée soit *via* la voie uvéo-sclérale, soit *via* le trabéculum et le canal de Schlemm (**figure 1**).

Les chambres antérieures et postérieures de l'œil sont en communication avec le vitrée, permettant ainsi la diffusion des facteurs solubles d'un compartiment à l'autre.

1.1.2. Le segment postérieur

Le vitrée est un gel très hydraté transparent qui occupe 80% du volume de l'œil. C'est la principale matrice extracellulaire de l'œil, le vitré lui donne sa forme et son volume. C'est un compartiment acellulaire, à l'exception des cellules hyalocyte de type macrophagique. Le vitré est composé essentiellement d'eau, ainsi que de fibrilles de collagène (Le Goff and Bishop, 2008).

La rétine est une fine membrane pigmentée qui tapisse l'arrière de l'œil et recouvre les trois quarts de la surface interne du globe oculaire. Son épaisseur varie de 100 à 200 μ m selon l'espèce (Masland, 1986). C'est une structure neurosensorielle, qui détecte la lumière puis la converti en message nerveux dans les photorécepteurs, par le phénomène de phototransduction. Avant d'envoyer ce message nerveux au cortex visuel, la rétine assure la filtration et le traitement préliminaire de l'information visuelle (cf 1.2.2).

La choroïde est une structure conjonctive hautement vascularisée sous la rétine, et localisée entre cette dernière et la sclère (**figures 2 et 3**). Son épaisseur varie entre 50 à 200 μ m selon l'espèce, l'âge et la localisation dans l'œil (Nickla and Wallman, 2010). Elle recouvre la totalité de la rétine à l'exception du nerf optique. La choroïde se prolonge dans le segment antérieur de l'œil par les corps

ciliaires. La choroïde assure 90% de l'oxygénation et de l'apport en nutriments de la rétine (Nickla and Wallman, 2010). Chez l'homme, elle est pigmentée afin d'absorber les photons résiduels non retenus par la rétine.

Histologiquement, elle s'organise en quatre à cinq structures superposées (**figure 3**) : la membrane de Bruch qui est en contact avec l'EPR, le choriocapillaris, les couches vasculaires à vaisseaux de moyennes et grandes tailles, et finalement la suprachoroïde qui est en contact avec la sclère.

- **La membrane de Bruch** est une structure conjonctive de faible épaisseur séparant les cellules EPR du reste de la choroïde. La membrane de Bruch est formée de trois couches de fibres conjonctives superposées, délimitées par les membranes basales associées aux cellules EPR et aux cellules endothéliales du choriocapillaris (Booij et al., 2010a).
- **Le choriocapillaris** est une couche fine de vaisseaux sanguins organisés en réseaux hautement anastomosés. Les parois de ces capillaires sont fenêtrées, avec des pores positionnés exclusivement face à l'EPR (**figure 3**) (Bill et al., 1983; McLeod et al., 2009). La perméabilité importante du choriocapillaris permet le passage de protéines et de fluides entre l'EPR et le choriocapillaris, ainsi que la création d'un gradient de pression oncotique favorisant ces échanges suite à l'accumulation de protéines sous l'EPR.
- **Les couches vasculaires de moyenne et grande taille**, dites respectivement de Sattler et Haller, sont occupées essentiellement par des vaisseaux et de nombreuses cellules immunocompétentes.
- **La suprachoroïde** est une structure conjonctive dans laquelle sont présentes des structures lymphatiques qui sont appelées « les lacunes » (De Stefano and Mugnaini, 1997; Poukens et al., 1998).
- **Le tapis** est une structure réfléchissante présente en arrière de la rétine chez certains vertébrés, tel que le chat ou le chien (Ollivier et al., 2004), mais absente chez l'humain, la souris et chez le rat (Nakaizumi, 1964a). Son rôle est de renvoyer vers la rétine la lumière non absorbée par celle-ci afin d'augmenter sa capacité de détection.

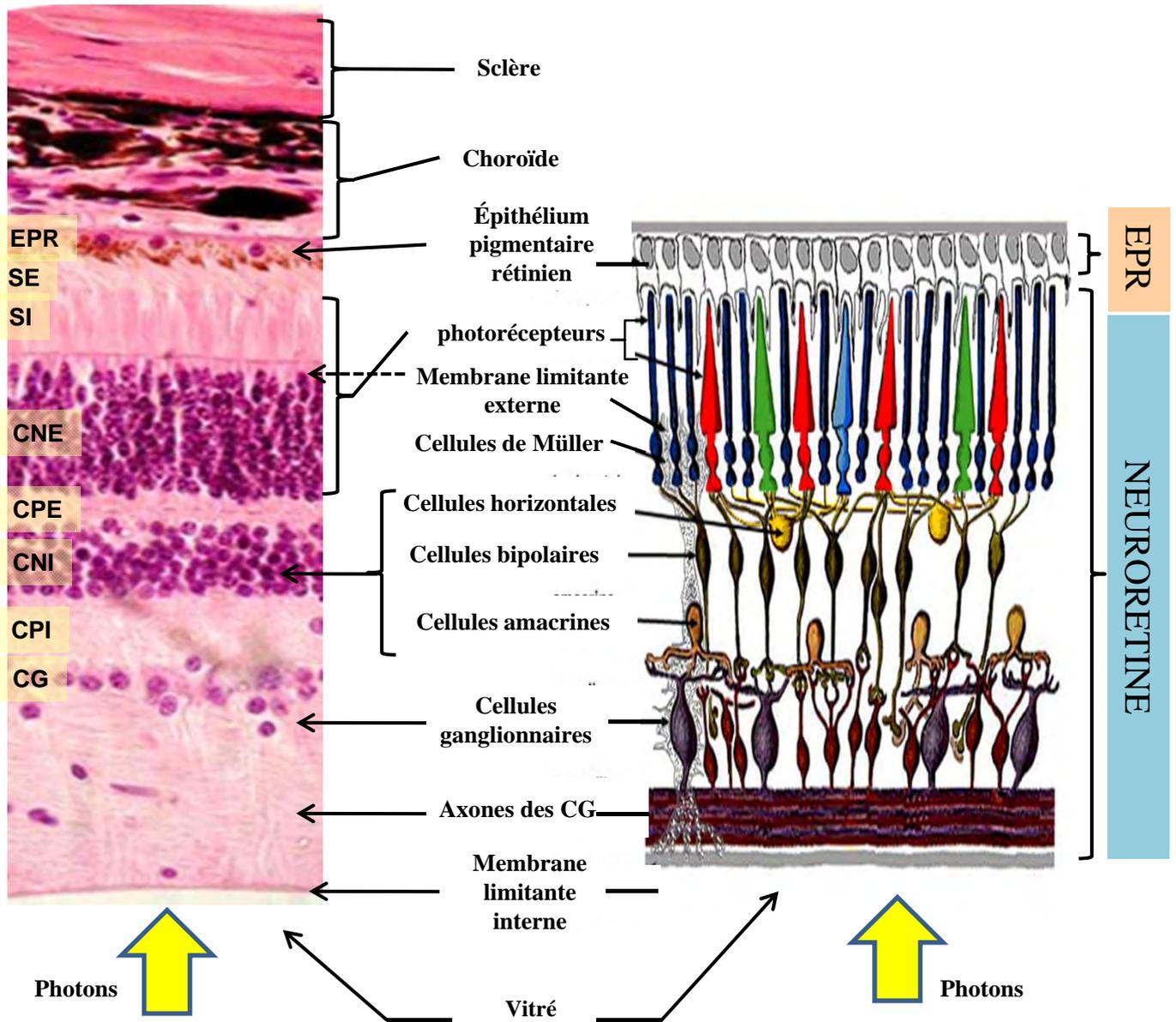


Figure 2. Structure de la rétine en coupe transversale.

Structure schématique de la rétine (droite) et coupe histologique transversale d'une rétine humaine (gauche).

La rétine est organisée en plusieurs couches cellulaires et synaptiques, qui forment des structures parallèles. La couche des cellules ganglionnaires (CG) est située dans la partie inférieure de ces illustrations. Les axones des cellules ganglionnaires forment le nerf optique, tandis que leurs dendrites forment des synapses avec les cellules bipolaires et amacrines dans la couche plexiforme interne (CPI). Les cellules bipolaires, amacrines et horizontales forment la couche nucléaire interne (CNI). Ces cellules forment à leur tour des synapses avec les photorécepteurs, au niveau de la couche plexiforme externe (CPE). Les photorécepteurs sont eux-même situés dans la couche nucléaire externe (CNE). Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont directement en contact avec les photorécepteurs dont les segments externes sont invaginés dans les microvillosités apicales des cellules de l'EPR. Sur la face externe de la rétine, on trouve directement la choroïde puis la sclère.

Illustrations issues de Webvision, Université de l'Utah aux USA (<http://webvision.med.utah.edu/>).

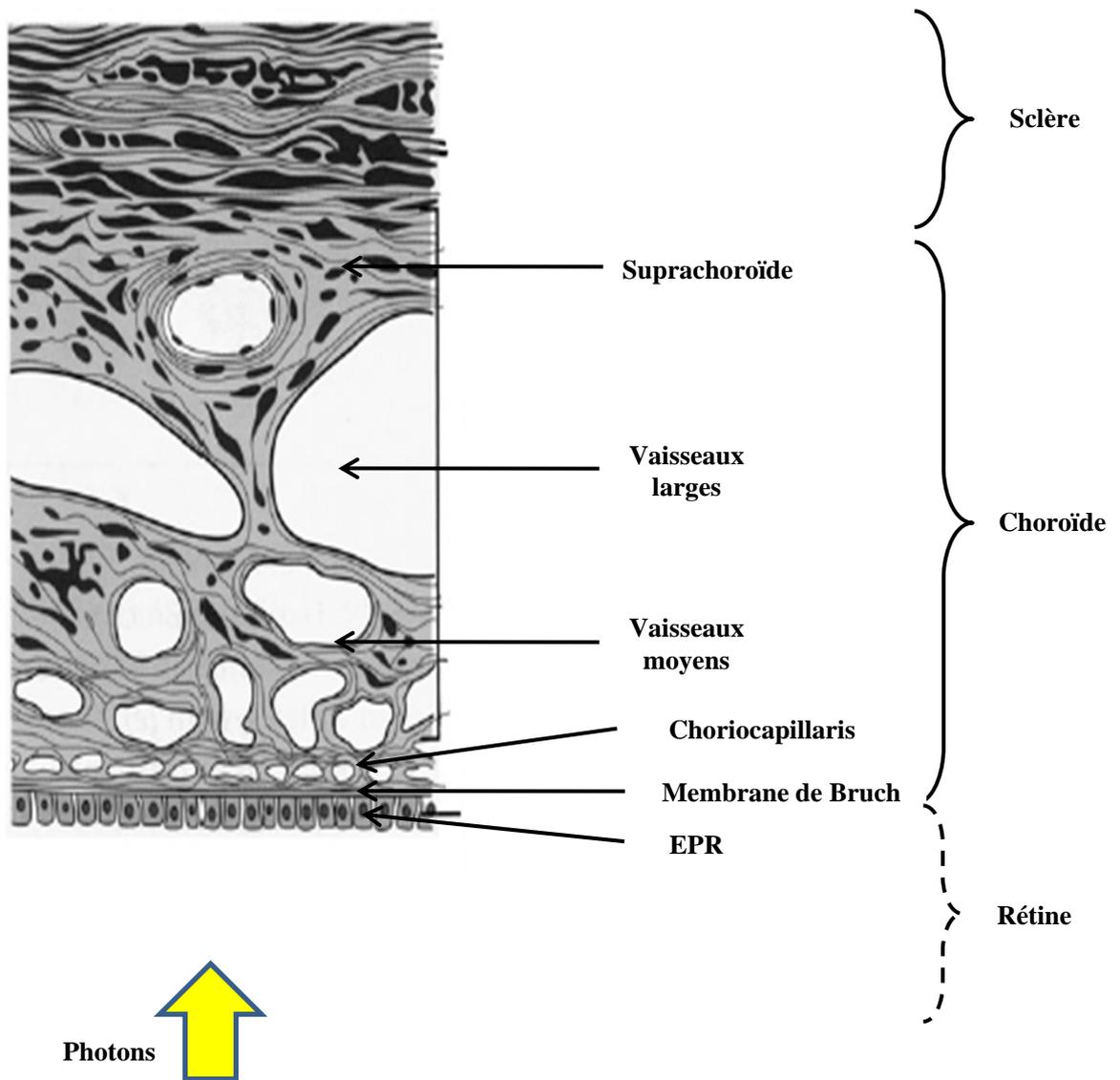


Figure 3. Schéma de la choroïde en coupe transversale.

La choroïde est une structure très vascularisée, située en arrière de la rétine, entre l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la sclère. La choroïde est composée d'une structure conjonctive (la membrane de Bruch), et de nombreuses structures vasculaires et lymphatiques (choriocapillaris, couches des vaisseaux moyens et larges, la suprachoroïde).

Illustrations issues de Nickla and Wallman 2010 Progress in Retinal and Eye Research.

1.2 Anatomie et physiologie de la rétine

La rétine est constituée de la neurorétine - qui est une composante nerveuse - et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) - qui est une composante épithéliale (**figure 3**). La neurorétine est constituée de plus de 50 types de neurones, plus ou moins différents anatomiquement, physiologiquement ou fonctionnellement, tandis que l'EPR est constitué d'un type unique cellulaire épithélial. Ces deux structures très spécialisées ont des rôles différents, mais elles sont fonctionnellement indissociables. L'organisation anatomique et fonctionnelle de la rétine est très conservée parmi les vertébrés (Yau and Hardie, 2009) (**figure 2**).

1.2.1 L'organisation histologique de la rétine

Histologiquement, la rétine est une structure laminaire organisée en 7 couches nucléaires et synaptiques (**figure 2**) (Masland, 2001a; Sanes and Zipursky, 2010). Depuis la partie externe de la rétine qui fait face à la choroïde, vers la face interne qui fait face à la choroïde, on trouve successivement :

- **La couche de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).** L'EPR est un épithélium uni-stratifié composé de cellules hexagonales, pigmentées par des vésicules de mélanine. Celles-ci sont compactées jointivement par des jonctions serrées qui forment collectivement une *zonula occludens* continue au niveau de l'EPR. Les cellules de l'EPR sont organisées en domaines apicaux et basaux morphologiquement et fonctionnellement distincts. Au niveau apical, les cellules de l'EPR forment des microvillosités dans lesquelles viennent s'emboîter les segments externes des photorécepteurs. Au niveau basal, les cellules de l'EPR sont en contact avec la choroïde, et plus précisément avec la membrane de Bruch. Cette organisation anatomique est essentielle à leurs fonctions de transports bidirectionnels de métabolites entre la choroïde et la neurorétine.
- **La couche des segments externes et internes des photorécepteurs (SE/SI).** Les SE constituent le domaine cellulaire des photorécepteurs spécialisés dans la détection de la lumière. Ils sont organisés en repliements membranaires empilés de façon compacte, dans lesquels sont ancrés les différents facteurs cellulaires nécessaires à la détection de la lumière. Les SI constituent le domaine cellulaire dans lequel sont concentrés de nombreuses mitochondries et ribosomes nécessaires à la formation et à la fonction des SE. En outre, les SI sont solidarisés jointivement entre eux et avec les cellules de Müller, par des jonctions serrées pour former une *Zonula Adherens* continue sur toute la surface de la rétine, c'est la membrane limitante externe (MLE).

- **La couche nucléaire externe (CNE).** La CNE est constituée du corps cellulaire des photorécepteurs. Les corps cellulaires des photorécepteurs de type bâtonnets sont localisés dans la partie externe de la CNE, proche des SE/SI. Les corps cellulaires des photorécepteurs de type cônes sont à l'inverse, localisés dans la partie interne de la CNE, au contact de la couche plexiforme externe. Les photorécepteurs sont au nombre d'environ 100 millions dans la rétine humaine (Curcio et al., 1990). Parmi ceux-ci 95% sont de type bâtonnet, alors que seulement 5% sont de type cône (Curcio et al., 1987; Curcio et al., 1990). En outre, l'épaisseur de la CNE est décroissante depuis le centre de la rétine vers la périphérie. La densité cellulaire des photorécepteurs de type cône est forte au centre de la rétine, et faible dans le reste de la rétine.
- **La couche plexiforme externe (CPE).** La CPE est formée de neurites et de synapses, et correspond à la projection des axones des photorécepteurs sur les dendrites des cellules bipolaires et horizontales.
- **La couche nucléaire interne (CNI).** La CNI est essentiellement constituée du corps cellulaires des cellules bipolaires, amacrines et horizontales. On y trouve aussi le corps cellulaire des cellules de Müller dont les processus cellulaires enveloppent les neurites et le corps cellulaire des neurones et des photorecepteurs.
- **La couche plexiforme interne (CPI).** La CPI est constituée des neurites et des synapses entre les cellules amacrines, bipolaires et ganglionnaire.
- **La couche des cellules ganglionnaires (CG).** La CG est constituée du noyau des cellules ganglionnaires, dont les axones courent à la surface interne de la rétine pour former le nerf optique. Au-dessus de la CG, on trouve les axones des cellules ganglionnaires, puis la membrane limitante interne (MLI) qui isole la rétine du vitré. La MLI est formée par une membrane basale de plusieurs centaines de nanomètres d'épaisseur et la projection des podocytes des cellules de Müller.

1.2.2 L'organisation fonctionnelle de la rétine

Fonctionnellement, on distingue plusieurs régions fonctionnellement différentes dans la rétine.

(1) La papille optique par laquelle les axones des cellules ganglionnaires sortent de l'œil pour former le nerf optique, et par laquelle passent les vaisseaux intra réiniens. (2) La macula et la fovéa forment une petite région de la rétine localisée dans le prolongement de l'axe optique de l'œil, et localisé environ centralement dans la rétine. La densité des photorécepteurs, et en particulier cellules de types cône, y est très importante chez le primate. La fovéa est la région centrale de la macula et elle est avasculaire. La fovéa est constituée exclusivement de cônes, et elle permet la vision de forte acuité et

des couleurs. **(3)** La rétine périphérique se définit par exclusion de la macula et de la fovéa. Elle est beaucoup moins dense en photorécepteurs, et elle assure la vision périphérique de faible acuité. On remarquera que les primates non humains disposent d'une fovéa, contrairement aux chiens et chats chez qui on retrouve une région homologue, dense en cônes, appelée *area centralis* (Ahnelt and Kolb, 2000; Mowat et al., 2008). Chez la souris et le rat, il n'existe pas à proprement parlé de macula et de fovéa.

De façon schématique, la rétine fonctionne de la façon suivante. Les photorécepteurs détectent la lumière et la convertissent en signal électrique. Ce signal électrique est ensuite séquentiellement transmis vers les cellules bipolaires, éventuellement vers les cellules amacrines, et finalement vers les cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique. Le message nerveux est transporté le long du tractus optique vers le noyau géniculé latéral dans l'hémisphère cérébral controlatéral. Les cellules horizontales et les cellules amacrines participent, en qualité d'interneurones, aux mécanismes d'inhibition latérale et de renforcement des contrastes spatiaux et temporels. Ces mécanismes permettent la ségrégation et la filtration de l'information visuelle (couleurs, forme, mouvement...). Ces mécanismes d'inhibitions latérales sont permis par l'activation de synapses inhibitrices, entre les cellules horizontales et amacrines, et les cellules photoréceptrices et bipolaires.

1.2.2.1 L'épithélium pigmentaire rétinien

L'EPR participe activement au maintien de la fonction des photorécepteurs d'une part *via* le recyclage des photopigments à travers le cycle des rétinoïdes (**figure 4**), et d'autre part *via* la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. L'EPR contribue aussi à la formation de la barrière hémato-rétinienne (BHR) et au statut immunoprivilégié de l'œil.

Le cycle des rétinoïdes permet le recyclage des photopigments (Smith et al., 2009) (**figure 4**). Les photopigments sont constitués d'un chromophore et de la molécule 11-cis-rétinal. La capture d'un photon par les photopigments induit la séparation du chromophore et du 11-cis-rétinal, qui est isomérisé en all-trans-retinal. Le cycle des rétinoïdes permet la transformation du all-trans-retinal en 11-cis-retinal, par une série de réaction enzymatique qui ont lieu dans les photorécepteurs et surtout dans l'EPR. L'enzyme RPE65 est essentielle au cycle des rétinoïde et à la production en continue de photopigment. La mutation du gène RPE65 est une cause de dégénérescence héréditaire de la rétine, et se traduit par un blocage de la fonction des photorécepteurs, la perte progressive de la fonction visuelle, et la dégénérescence de la rétine (cf. 1.4.1).

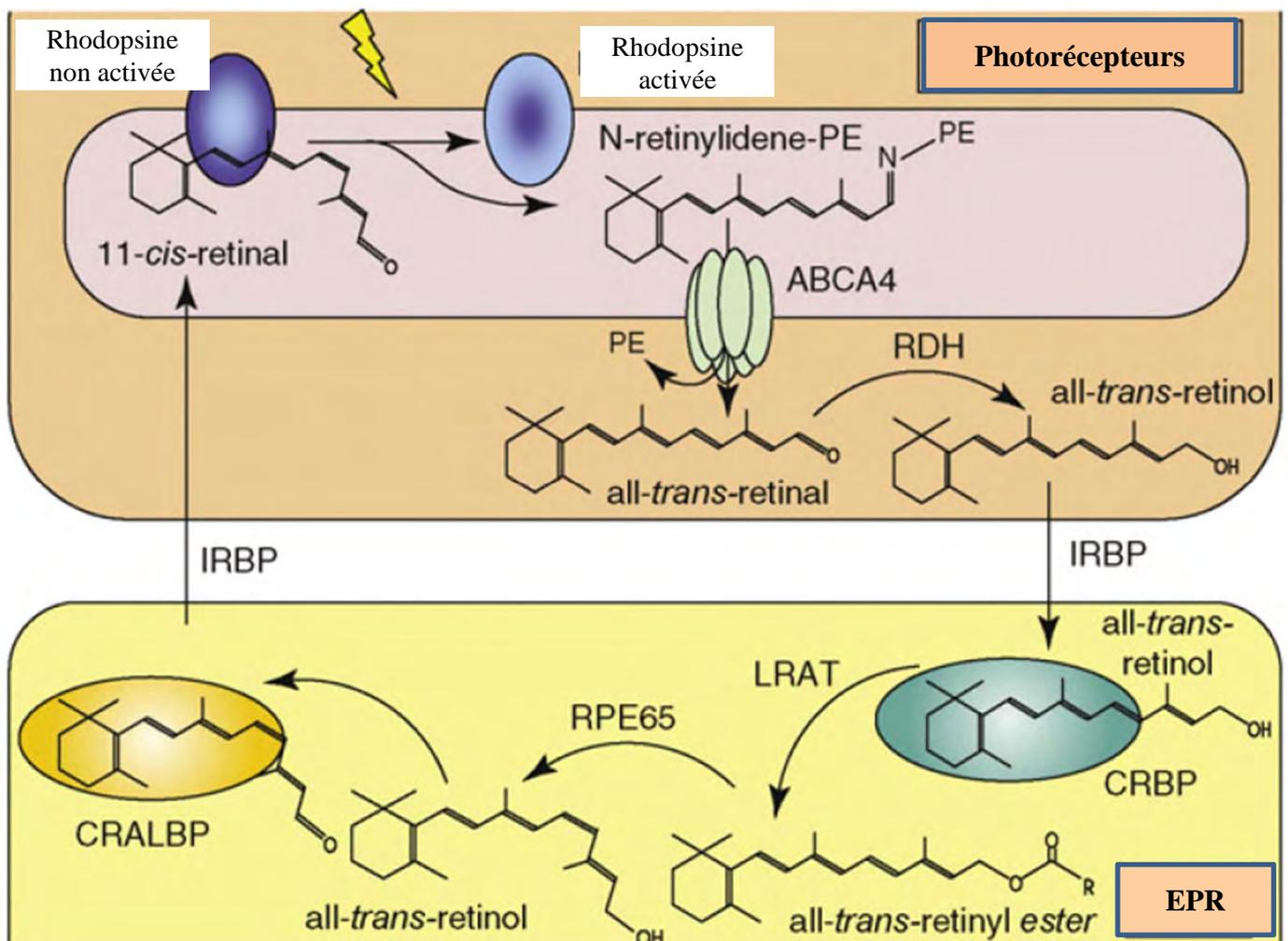


Figure 4. Schéma du cycle des rétinoïdes.

Le cycle des rétinoïdes correspond à une série de réactions biochimiques qui permettent le recyclage des photopigments activés à la lumière. Il a pour but de transformer le all-trans-rétinal (ATRA) non fonctionnel dans les photopigments, en 11-cis-rétinal fonctionnel. Ceci est réalisé par une série de réactions biochimiques qui ont lieu principalement dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

Les photopigments sont constitués d'un chromophore, l'opsine, et d'un dérivé de la vitamine A, le 11-cis-rétinal. L'excitation des photopigments par la lumière induit l'isomérisation de 11-cis-rétinal en ATRA, et sa dissociation d'avec l'opsine. La molécule ATRA est ensuite transformée séquentiellement en différents intermédiaires métaboliques par des enzymes exprimées dans les photorécepteurs et dans les cellules de l'EPR. Le cycle des rétinoïdes a ainsi lieu dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, où les dérivés de la vitamine A sont successivement transportés.

Illustration issue de Smith 2009 Trends in Genetics.

1.2.1.1 La neurorétine

La neurorétine est organisée en réseaux neuronaux complexes. Ces réseaux neuronaux sont de type convergeant entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Masland, 2001b). Cette organisation complexe permet à la rétine d'assurer ses fonctions complexes de détection et de traitement préliminaire de l'information lumineuse (Gollisch and Meister). Les différentes fonctions de la neurorétine sont : (1) La détection de la lumière et son codage en message nerveux. (2) La séparation du signal nerveux en deux circuits nerveux fonctionnels distincts dit « ON » et « OFF » qui vont respectivement aboutir à une dépolarisation ou à une hyperpolarisation des cellules ganglionnaires en réponse à la lumière. (3) La ségrégation de l'information chromatique en 3 canaux nerveux correspondant aux couleurs rouge, vert et bleu. (4) L'amplification de l'information de contraste présent dans le champ visuel, pour permettre son interprétation. (5) La détection de certains éléments ou événements particuliers dans le champ visuel, tel que le mouvement d'un objet lumineux dans une direction précise. (6) L'adaptation aux variations de luminosité environnementale. (7) La synchronisation du cycle circadien avec les variations de lumière entre le jour et la nuit.

1.2.1.1.1 Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont au nombre d'environ 100 millions dans la rétine humaine (Curcio et al., 1990). Parmi ceux-ci 95% sont de type bâtonnets, alors que seulement 5% sont de type cône (Curcio et al., 1987; Curcio et al., 1990). Les photorécepteurs sont les seules cellules photosensibles de la rétine avec les cellules ganglionnaires à mélanopsine. Cependant, les photorécepteurs sont de très loin les cellules les plus nombreuses, et les seuls à être capable de réaliser le phénomène de la phototransduction. Ce mécanisme permet la conversion des photons en influx nerveux *via* une série d'évènements biochimiques et électrophysiologiques qui ont lieu dans le segment externe des photorécepteurs.

Les photorécepteurs sont organisés en sous-domaines cellulaires hautement spécialisés (**figure 5**).

➤ **Le segment externe** possède tous les facteurs cellulaires nécessaires au phénomène de phototransduction. Les photopigments ont pour rôle de capter les photons de façon individuelle, et d'activer en réponse la cascade de phototransduction. Le phénomène de phototransduction permet de convertir de façon proportionnelle et adaptative, les variations de luminosité en variations de potentiels électriques membranaires (Fain et al., 2001). La cascade de phototransduction est présentée dans le sous chapitre 1.2.2.2.1.2.

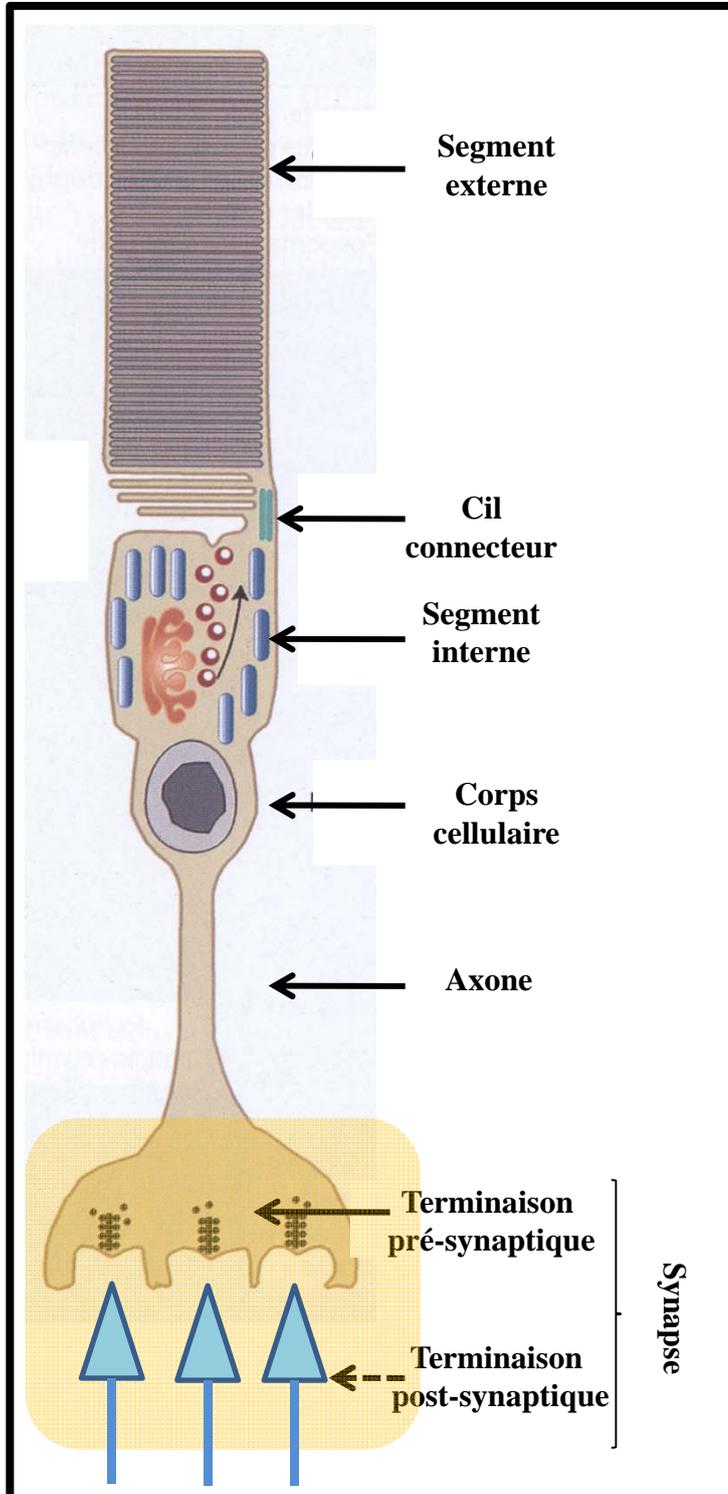


Figure 5. Schéma de la structure d'un photorécepteur de type bâtonnet.

Les photorécepteurs sont les cellules de la rétine spécialisées dans la détection de la lumière et sa conversion en message nerveux via la phototransduction.

Les photorécepteurs sont organisés en 4 domaines cellulaires spécialisés fonctionnellement : les segments externes et internes, le corps cellulaire, et la terminaison pré-synaptique

Le segment externe correspond à un empilement de disques membranaires dans lesquelles sont ancrés les photopigments. Le segment interne contient de nombreuses mitochondries et ribosomes. Le cil connecteur relie les segments internes et externes, et permet le transport d'une grande variété de facteurs cellulaires. Le corps cellulaire contient le noyau. L'axone est une structure spécialisée permettant la conduction des variations de potentiel membranaire vers la synapse. La synapse permet de transmettre l'information nerveuse aux cellules bipolaires et horizontales via la libération de glutamate.

Illustration issue de Retina 4ème édition, 2005, Elsevier Mosby.

- **Le segment interne et le corps cellulaire** assurent le métabolisme énergétique et les fonctions de synthèse nécessaires au maintien de l'activité spécialisée des photorécepteurs. Ils permettent aussi la propagation des variations de potentiel membranaire vers l'axone et la synapse.
- **L'axone** permet la propagation des variations de potentiel membranaire entre le corps cellulaire et la terminaison pré-synaptique.
- **La terminaison pré-synaptique** permet la communication entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires et horizontales. La terminaison pré-synaptique a pour rôle de convertir les variations de luminosité, et plus précisément les variations de potentiel membranaire, en libération de bolus de neurotransmetteurs glutamate.

1.2.1.1.1 Les photorécepteurs de types bâtonnets et cônes

Il existe quatre types de photorécepteurs chez l'homme : un type de photorécepteurs « bâtonnet » majoritaire dans la rétine avec environ 95 millions de cellules chez l'homme, et trois types de photorécepteurs « cône » qui représentent environ 5 millions de cellules dans la rétine humaine. La vision trichromatique chez l'homme repose sur l'existence de ces trois types de cône (Osorio and Vorobyev, 2008).

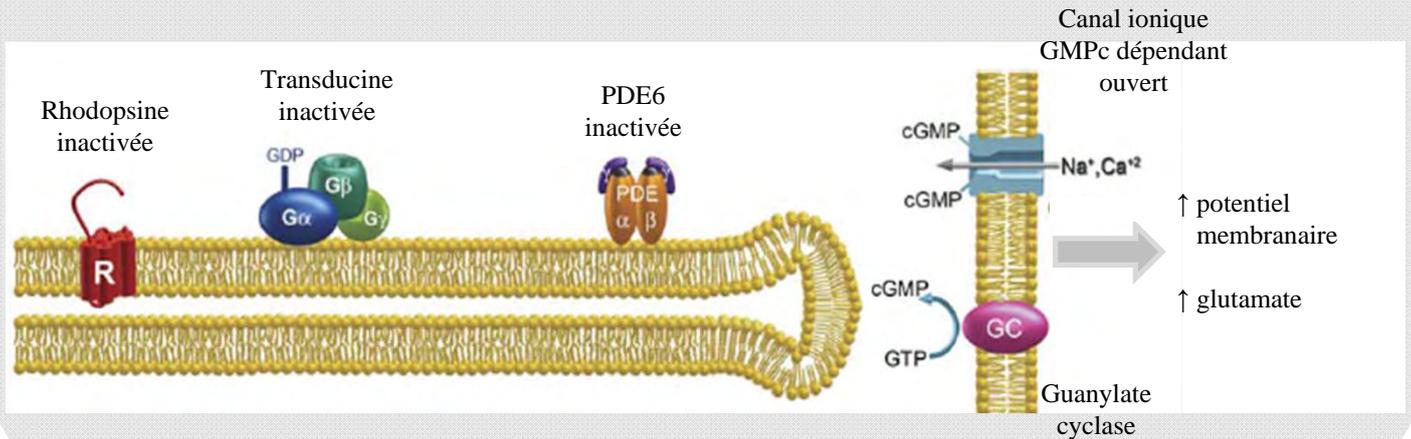
Les bâtonnets assurent la vision peu résolutive, non chromatique, et en condition de faible luminosité. Leur photopigment unique, la rhodopsine, a un pic d'excitation à 495nm (Baylor et al., 1984; Kraft et al., 1993).

Les cônes permettent les visions de forte acuité, chromatiques, et en condition de forte luminosité. Les trois types de cônes expriment respectivement les photopigments « cônes opsines » spécialisés dans la détection des couleurs bleu, vert et rouge. Ils expriment respectivement les photopigments bleu, vert et rouge. Leur pic d'excitation respectif est 437nm, 533nm et 567nm (Baylor et al., 1984; Schnapf et al., 1987).

1.2.1.1.2 La cascade de phototransduction

La cascade de phototransduction permet la conversion des photons en influx nerveux. Elle correspond à une série d'évènements biochimiques et électrophysiologiques qui ont lieu dans le segment externe des photorécepteurs (Burns and Arshavsky, 2005). Les principaux évènements de l'activation de la cascade de phototransduction sont présentés ici brièvement (**figure 6**).

Obscurité



Lumière

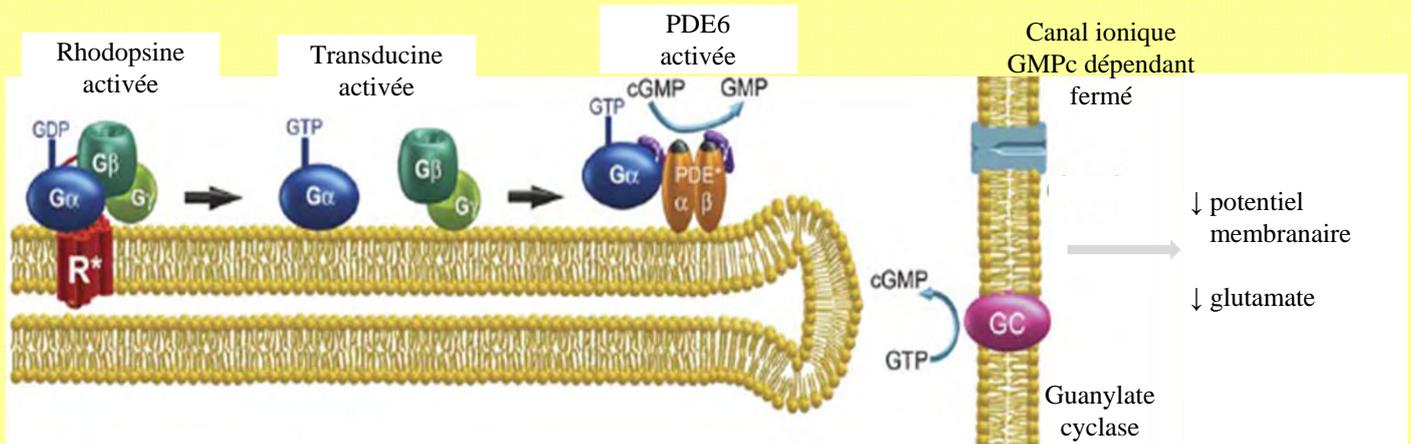


Figure 6. Schéma de la cascade de phototransduction dans les photorécepteurs de type « bâtonnet ».

La cascade de phototransduction a lieu au niveau des segments externes des photorécepteurs. Elle permet de convertir la lumière en variations de potentiels membranaires.

À l'obscurité, la rhodopsine (R) est à l'état de repos. La cascade de phototransduction n'est pas activée. La concentration cellulaire en GMPc (cGMP) est grande, et induit l'ouverture des canaux ioniques Ca²⁺/Na⁺ dépendants du GMPc. L'activation des ces canaux ioniques Ca²⁺/Na⁺ induit l'influx d'ions Ca²⁺ et Na⁺, et la dépolarisation de la membrane des photorécepteurs. La dépolarisation des photorécepteurs induit la libération de glutamate au niveau de la terminaison pré-synaptique.

A la lumière, la rhodopsine est activée et isomérisée (R*). R* induit l'activation de la cascade de phototransduction, et plus précisément l'activation de la transducine (G α G β G γ). L'activation de la transducine se traduit par la dissociation de l'unité catalytique G α , des unités G β et G γ . G α active la phosphodiésterase 6 (PDE6). PDE6 hydrolyse le GMPc et induit la fermeture des canaux ioniques dépendants du GMPc. La diminution de l'influx d'ions Ca²⁺ et Na⁺ induit finalement l'hyperpolarisation de la membrane. L'hyperpolarisation des photorécepteurs induit la diminution de la libération de glutamate, au niveau de la terminaison pré-synaptique.

Illustration issue de Burns 2005 Neuron.

La cascade de phototransduction est initiée par l'absorption d'un photon par un photopigment. Ceci induit l'isomérisation du photopigment et l'activation de la protéine G transducine. La protéine G transducine active alors la phosphodiésterase 6 (PDE6), qui est exprimé spécifiquement dans les photorécepteurs. PDE6 est une enzyme qui hydrolyse les molécules de guanosine mono-phosphate cyclique (GMPc) présentes dans le cytosol des photorécepteurs, en guanosine non cyclique (GMP). Ainsi à l'obscurité, la concentration en GMPc dans les photorécepteurs est importante dans les segments externes, tandis qu'à la lumière la concentration en GMPc chute du fait de son hydrolyse par PDE6 (Newsome et al., 1980; Orr et al., 1976). Dans les photorécepteurs, le GMPc est synthétisé par l'enzyme guanylate cyclase que ce soit à l'obscurité ou à la lumière. Les variations de GMPc régulent directement l'ouverture des canaux ioniques GMPc dépendants présents dans les segments externes. L'ouverture de ces canaux ioniques induit un influx intracellulaire d'ions Na^+ et Ca^{2+} , et donc la dépolarisation de la membrane des photorécepteurs. Ainsi à l'obscurité, la membrane des photorécepteurs est dépolarisée en continu, tandis qu'à la lumière, la membrane des photorécepteurs est hyperpolarisée proportionnellement à l'intensité de la lumière qui les stimule.

Ces variations de potentiels membranaires se propagent le long du corps cellulaire des photorécepteurs, puis dans l'axone où elles modulent la libération du neurotransmetteur glutamate au niveau de la synapse. La quantité de glutamate libérée par les photorécepteurs est directement proportionnelle à l'amplitude de la dépolarisation membranaire, et donc inversement proportionnelle à l'intensité de la lumière incidente. À l'obscurité, la libération de glutamate est maximale, tandis qu'à la lumière celle-ci est diminuée, signalant ainsi aux cellules bipolaires et horizontales la détection de lumière. Le recyclage des photopigments isomérisés par la lumière est permis par le cycle des rétinoïdes qui a lieu dans les photorécepteurs et l'EPR (**figure 4**).

1.2.1.1.2 Les cellules horizontales

Les cellules horizontales sont des neurones inhibiteurs à GABA. Les cellules horizontales sont en contact d'une part avec les photorécepteurs *via* leurs dendrites, et d'autre part avec les cellules photoréceptrices et bipolaires avoisinantes *via* leur axone (**figure 2**). Leur rôle est d'induire un feedback négatif appelé inhibition latérale qui tend à bloquer la transmission d'influx nerveux issue des photorécepteurs adjacents dont l'illumination est plus faible. Ce mécanisme permet d'adapter la réponse de la rétine à différentes conditions d'intensité de lumière, et d'augmenter l'information de contraste.

1.2.1.1.3 Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont des neurones excitateurs à glutamate. Leur rôle est le filtrage et la conduction de l'information nerveuse entre les photorécepteurs et les cellules amacrines (**figures 2**).

Chez le primate, chaque cellule bipolaire est connectée en moyenne à 20 photorécepteurs dans la rétine périphérique (Grunert and Martin, 1991), cela représente un des 2 points majeurs de la convergence de l'information nerveuse dans la rétine. Cependant dans la fovéa, les cellules bipolaires se connectent à 1 seul photorécepteur afin d'assurer une vision très résolutive que ce soit pour les couleurs ou l'acuité. Il existe deux grandes catégories de cellules bipolaires : les cellules bipolaires à bâtonnets (CBB) et les cellules bipolaires à cônes (CBC). Les CBC sont deux fois plus nombreuses que les CBB, ce qui permet aux cônes d'assurer leur fonction de vision à forte acuité. Cette organisation est l'origine de la discrimination des voies de signalisation des bâtonnets et des cônes, de la vision chromatique, et de l'information de contraste (Bloomfield and Dacheux, 2001; Boycott and Hopkins, 1991; Gollisch and Meister, 2010). En outre, on distingue plusieurs populations de cellules bipolaires en fonction de leur activité électrique à la lumière. Les cellules bipolaires ON qui se dépolarisent à la lumière et s'hyperpolarise, tandis que les cellules bipolaires OFF s'hyperpolarisent, enfin les cellules bipolaires ON-OFF se dépolarisent au début et à la fin d'un stimulus lumineux. Ces cellules bipolaires contribuent à la formation et à la fonction des champs récepteurs dans la rétine, et donc au traitement de l'information visuelle (Gollisch and Meister, 2010).

1.2.1.1.4 Les cellules amacrines

Il existe une grande diversité fonctionnelle de ces cellules amacrines. Elles participent de façon complexe à différents circuits rétiniens qui sont à l'origine de nombreux phénomènes d'adaptation et de traitement de l'information visuelle, tels que l'adaptation de la rétine aux variations d'intensité de la lumière, ou au contrôle de la motricité oculaire (MacNeil and Masland, 1998; Yoshida et al., 2001). En outre, les cellules amacrines permettent le branchement terminal de la voie visuelle des bâtonnets sur celle des cônes. Contrairement aux CBC, les CBB ne se projettent pas directement sur les cellules ganglionnaires. Les CBB se projettent sur les cellules amacrines qui se projettent à leur tour sur les CBC. De ce fait, la voie visuelle issue des bâtonnets se greffe sur la voie visuelle issue des cônes.

1.2.1.1.5 Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires (CG) sont essentiellement des neurones à glutamate. Leur axone forme le nerf optique. Il en existe environ 15 à 20 types différents. Ces différents types de cellules ganglionnaires sont caractérisés par la fonction des circuits neuronaux auxquels ils participent et par la nature de la réponse électrophysiologique qu'ils génèrent en réponse à la lumière. En effet, certaines cellules ganglionnaires sont stimulées exclusivement par une couleur donnée, par certaines variations d'intensité de lumière, ou encore par le déplacement d'un objet dans le champ visuel dans

une direction bien précise (Barlow and Levick, 1965; Boycott and Hopkins, 1991; Dacey, 1993; Gollisch and Meister, 2010; Levick, 1967; Oyster et al., 1972). En outre, les cellules ganglionnaires photosensibles exprimant le photopigment mélanopsine sont impliquées dans la régulation des rythmes circadiens et du réflexe pupillaire (Berson, 2003; Rollag et al., 2003).

1.2.1.1.6 Les cellules gliales de la neurorétine

Les trois principales cellules gliales rétiniennes sont les cellules de Müller, les astrocytes, et les cellules microgliales.

1.2.1.1.6.1 Les cellules de Müller

Les cellules de Müller ont un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie de la rétine (Bringmann et al., 2006; Jadhav et al., 2009). Elles participent (1) au recyclage des neurotransmetteurs et des photopigments, (2) à l'homéostasie aqueuse, ionique et du pH du milieu extracellulaire, (3) au métabolisme énergétique des neurones de la rétine, et (4) à la clairance des déchets métaboliques. En outre, les cellules de Müller sont en contact étroit avec les cellules endothéliales des capillaires intra-rétiens dont elles régulent la perméabilité, et avec lesquelles de nombreux échanges de métabolites ont lieu (Kaur et al., 2008).

1.2.1.1.6.2 Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont présentes dans toute la rétine. Ce sont des cellules macrophagiques, phagocytaires et présentatrices d'antigène exprimant le CMH II (Chen et al., 2002; Kaneko et al., 2008; Penfold et al., 1993; Thanos et al., 1996). Dans le contexte physiologique normal, leur action semble être d'ordre immunosuppresseur, ce qui contribue au privilège immunitaire de l'œil (Broderick et al., 2000; Robertson et al., 2002). À l'inverse, dans un contexte pathologique, l'activation microgliale participe à la mise en place de réactions pro-inflammatoires, en réponse à un pathogène ou une dégénérescence rétinienne de type RP (Roque et al., 1996; Schuetz and Thanos, 2004; Zeng et al., 2005).

1.2.1.1.6.3 Les astrocytes

Ils sont localisés au-dessus des cellules ganglionnaires, au niveau des vaisseaux sanguins intra-rétiens, et sous la MLI. Au cours du développement, les astrocytes participent à la mise en place de la vascularisation intra-rétinienne et de la BHR (Fruttiger, 2007; Gariano, 2010; Stone et al., 1995). À l'âge adulte, les astrocytes participent, avec les cellules de Müller, à la régulation du débit sanguin intra-rétinien (Koehler et al., 2009; Metea and Newman, 2006) et à la régulation de l'activité

électrique de la rétine (Newman, 1994). Les astrocytes favorisent aussi l'expression des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et le maintien de l'intégrité de la BHR (Gardner et al., 1997).

1.3 La barrière hémato-oculaire et le privilège immunologique de l'œil

1.3.1 La vascularisation de l'œil

L'œil est l'un des organes les plus vascularisés de l'organisme proportionnellement à sa taille et à sa masse. La vascularisation de l'œil est assurée par une branche de l'artère carotide interne : l'artère ophtalmique. Celle-ci se subdivise de façon complexe en plusieurs artères ciliaires pour irriguer l'œil (**figure 7**) (Dartt et al., 2010; Hogan et al., 1971). On distingue généralement dans l'œil deux réseaux vasculaires : la circulation sanguine uvéale et la circulation sanguine intra-rétinienne (**figure 7**). L'ensemble du drainage veineux de l'œil converge essentiellement vers les veines ophtalmiques.

La circulation sanguine uvéale irrigue la choroïde, les corps ciliaires et l'iris :

- **La circulation choroïdienne** coure le long de la choroïde, entre l'EPR et la sclère. Elle est responsable de la nutrition de l'EPR, des photorécepteurs et des cellules bipolaires (**figure 7B**). Les vaisseaux choroïdiens ont un débit sanguin rapide et contiennent près de 85% du volume sanguin oculaire, avec près de 70% de celui-ci dans le choriocapillaris (Parver et al., 1980). Le choriocapillaris est constitué d'un réseau d'artérioles non fenêtrées, fortement perméables, en contact directe avec la membrane de Bruch, à travers laquelle les échanges de gaz et de métabolites ont lieu avec l'EPR. Les cellules de l'EPR permettent la diffusion des gaz (CO₂ et O₂) ainsi que le transport actif des nutriments et des produits du métabolisme de la rétine. La présence de nombreuses microvillilosités et protrusions membranaires aux pôles apicaux et basaux des cellules de l'EPR, permet d'augmenter la surface d'échange disponible entre les compartiments choroïdiens et rétinien (Ryan, 2006). Le choriocapillaris est en communication avec les vaisseaux veineux profonds de la choroïde.
- **Les vaisseaux des corps ciliaires** sont fenêtrés et perméables à des particules de grandes tailles (Bill and Nilsson, 1985).
- **Les vaisseaux de l'iris** sont non-fenêtrés et faiblement perméables (Bill and Nilsson, 1985).

La circulation intra-rétinienne assure principalement la nutrition des cellules ganglionnaires et amacrines (**figure 7B**). La vascularisation intra-rétinienne a pour origine l'artère rétinienne centrale qui entre dans la rétine par le disque optique, puis se divise en quatre artérioles principales qui s'arborescent dans les quatre quadrants de la rétine (**figure 7A**). Le réseau vasculaire intra-rétinien

vascularise l'ensemble de la surface de la rétine, sauf la fovéa. La circulation rétinienne s'organise en 2 réseaux parallèles. (1) D'une part en un réseau principal et superficiel qui coure entre la couche des cellules ganglionnaires, et celle formée par les cellules amacrines et bipolaires. (2) D'autre part, un réseau profond directement issu du réseau superficiel, et qui s'arborise jusque dans la couche plexiforme externe (Flower et al., 1985; Stone et al., 1995; Toussaint et al., 1961). Les vaisseaux intra-rétiens sont non fenêtrés et imperméables à la diffusion passive des métabolites tels que le glucose. Les cellules endothéliales qui forment la paroi de ces vaisseaux, sont solidarisées par des jonctions serrées. Ces vaisseaux sont entourés d'une membrane basale, et ils sont aussi associés à des cellules contractiles – les péricytes - ainsi qu'à des cellules gliales – les astrocytes et les cellules de Müller (Kaur et al., 2008; Kuwabara and Cogan, 1963). Le transport de métabolites à travers l'endothélium se fait activement par endocytose en passant par le système endosomal cellulaire, ou par transcytose, c'est-à-dire en traversant directement la cellule dans des vésicules (Kaur et al., 2008). Le drainage veineux du réseau intra-rétinien est effectué par la veine rétinienne centrale qui sort de l'œil par la papille optique.

1.3.2 La barrière hémato-rétinienne

L'organisation anatomique de la vascularisation rétinienne permet d'isoler et de protéger partiellement la rétine, des pathogènes et des substances toxiques circulantes éventuellement dans le sang, mais aussi du système immunitaire. Cette organisation anatomique est désignée sous le nom de barrière hémato-oculaire (BHR) (Cunha-Vaz, 1979). Celle-ci est en de nombreux points similaire à la barrière hémato-méningée (BHM) qui protège et isole le système nerveux central (SNC) du reste de l'organisme (Zlokovic, 2008). La BHR a pour objectif essentiel de maintenir l'homéostasie de la rétine et des compartiments liquidiens oculaires, afin de permettre le bon fonctionnement de l'œil qui est un organe particulièrement sensible aux phénomènes inflammatoires. De ce fait, la BHR régule et filtre de façon stricte les échanges entre l'œil et les compartiments sanguins, et limite l'entrée de tous les éléments potentiellement nocifs au bon fonctionnement de l'œil. Parmi ceux-ci, on trouve les virus, les microorganismes, certains des facteurs sanguins tels que les anticorps, et les cellules immunocompétentes... (Kaur et al., 2008).

Ainsi différentes études de perméabilité de la BHR ont montré après administration systémique de différents soluté chez le primate, le chat, le lapin et le rat, que la BHR est imperméable aux solutés tels que le bleu de trypan ou à de petites protéines recombinantes telles que la micro-peroxydase dont le diamètre est inférieur à 2nm (Bellhorn, 1981 ; Cunha-Vaz, 1966; Peyman et al., 1971; Smith and Rudt, 1975).

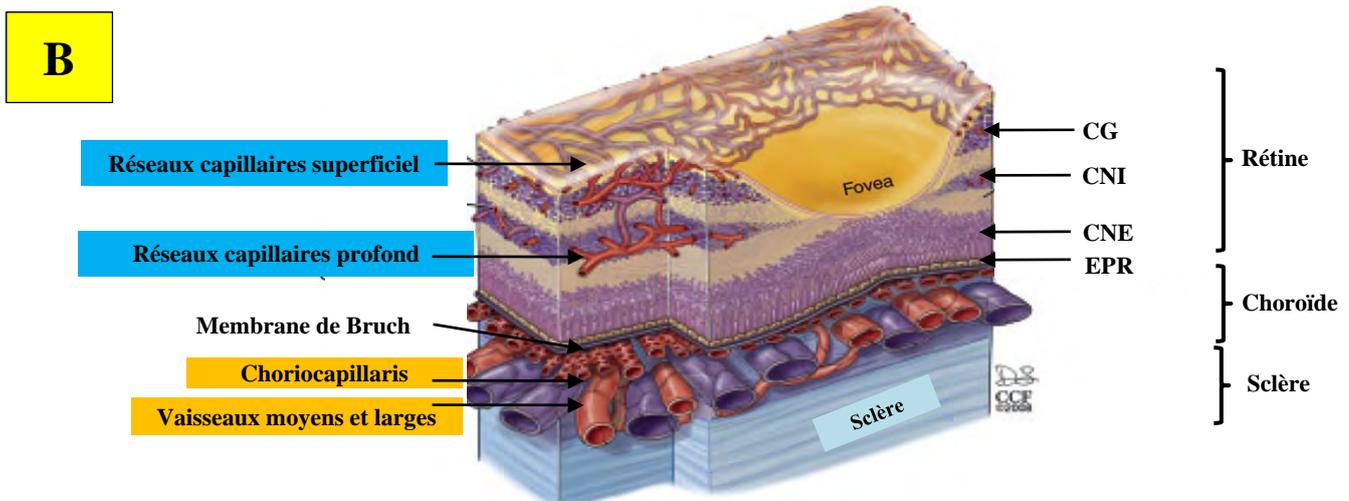
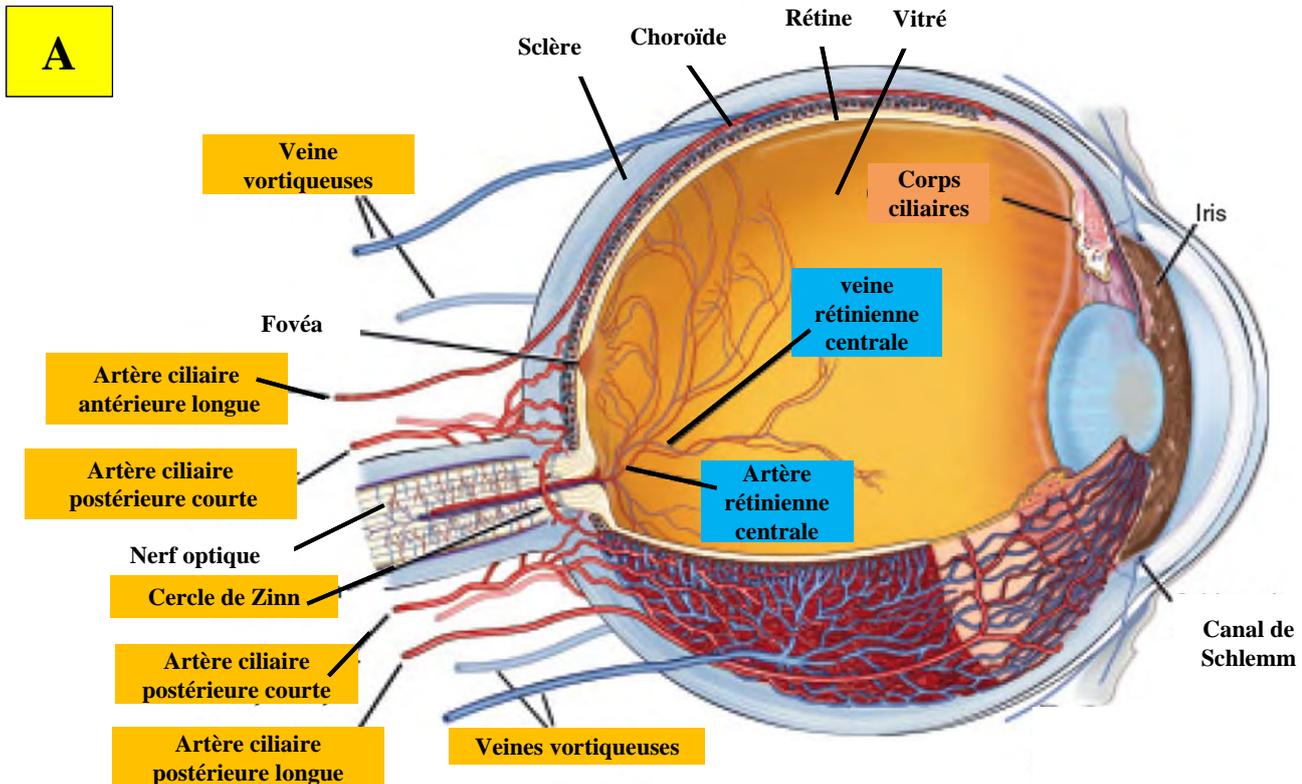


Figure 7. Schéma de la vascularisation choroïdienne et intra-rétinienne dans l'œil.

La vascularisation se divise en 2 réseaux distincts : la vascularisation choroïdienne qui est représentée en orange et la vascularisation intra-rétinienne est représentée en bleu.

La vascularisation choroïdienne est issue des artères ciliaires (A), et produit un réseau très dense sous la sclère afin de vasculariser la choroïde, les corps ciliaires et l'iris. La vascularisation choroïdienne se compose du choriocapillaris très fenêtré (B), qui est adjacent à l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), et des vaisseaux moyens et larges profonds non fenêtrés.

La vascularisation intra-rétinienne est issue de l'artère rétinienne centrale et entre dans l'œil avec le nerf optique (A). L'artère centrale rétinienne se divise en branches pour irriguer toute la surface de l'œil. Le réseau vasculaire intra-rétinien se divise en deux réseaux (B), l'un superficiel, et l'autre profond, qui sont très denses et très anastomosés dans toute la rétine à l'exclusion de la fovéa.

Épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Couche nucléaire externe (CNE). Couche nucléaire interne (CNI). Cellules Ganglionnaires (CG).

Illustrations issues de Anand-Apte and Hollyfield, Dartt 2010 Encyclopedia of the Eye.

La BHR est formée de la BHR interne (BHRi) et la BHR externe (BHRe) :

- **La BHRi** isole la rétine de la circulation intra-rétinienne. Elle est formée par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui sont non-fenêtrées. La BHRi est imperméable à la diffusion passive des macromolécules, des électrolytes, et des solutés tels que le glucose (Davson et al., 1949; Peyman et al., 1971).
- **La BHRe** isole la rétine de la circulation choroïdienne, et en particulier du choriocapillaris très perméable. Elle est formée par les cellules de l'EPR, et plus précisément par leurs jonctions serrées qui collectivement forment des *zonula adherens* et *zonula occludens* continues sur la face externe de la rétine. Les échanges entre la rétine et la choroïde sont essentiellement réalisés *via* les cellules de l'EPR par des mécanismes de transports actifs bidirectionnels (Kaur et al., 2008; Peyman et al., 1971).

En outre, la rétine est partiellement isolée du compartiment vitréen par **la membrane limitante interne** (MLI), et de l'espace sous-rétinien et de l'EPR par **la membrane limitante externe** (MLE) (**figure 3**).

- **La MLI** est présente sur la face interne de la rétine (Halfter et al., 2008) et correspond à une membrane basale de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur, apposée au-dessus des cellules ganglionnaires. La MLI est constituée entre autres de molécules de collagène et de laminine, ainsi que par les podocytes des cellules de Müller. La MLI permet l'adhésion de la rétine au vitré et le filtrage des cellules et des macromolécules présentes dans le vitré (Mordenti et al., 1999b; Peyman et al., 1971).
- **La MLE** est localisée au niveau des photorécepteurs, et limite la circulation des particules de plus de 3 nm diamètre entre l'espace sous rétinien et la neurorétine (Bunt-Milam et al., 1985). Elle est formée par les jonctions serrées entre les photorécepteurs et les cellules de Müller qui forment collectivement une *zonula adhérens* continue au sein de la couche des photorécepteurs, au niveau des segments internes, et ceci sur presque toute la surface de la rétine (Marmor, 1999).

1.3.3 Le privilège immunologique de l'œil.

Le statut immunoprivilégié de l'œil se définit par sa capacité à tolérer la présence d'un antigène sans induire les réactions immunitaires observées classiquement dans les autres organes en pareil cas (Medawar, 1948). Ceci est permis localement par la mise en place de phénomènes d'ignorance immunologique, de tolérisation antigénique, et d'un microenvironnement

immunosuppresseur similaire à celui présent dans le cerveau (Forrester et al., 2008; Niederkorn, 2006; Streilein, 2003).

La BHR et la MLI préviennent l'entrée de cellules immunocompétentes dans la rétine, et la sortie des antigènes vers la circulation sanguine, ce qui pourrait induire le développement de réactions immunes. En outre, le drainage lymphatique de l'œil est considéré comme relativement pauvre, ce qui limite le transport des antigènes vers les ganglions lymphatiques (Plskova et al., 2004; Xu et al., 2007). Cet isolement immunologique de l'œil contribue au phénomène d'ignorance immunologique. Ce phénomène d'ignorance immunologique est renforcé par la sous expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II, à la surface des cellules rétinienne (Medawar, 1948; Zhang et al., 1997). Enfin, les cellules présentatrices d'antigènes sont peu présentes dans l'œil, à l'exception des cellules microgliales rétinienne.

D'autre part, un phénomène de tolérance immunologique est mis en place dans l'œil, appelé « Anterior Chamber Associated Immune Deviation » (ACAID) (**figure 8**) (Streilein, 2003). L'ACAID correspond à la mise en place d'une réaction immunitaire altérée par rapport à ce qui est attendu normalement, c'est-à-dire la mise en place d'une réaction inflammatoire et le développement d'une réponse immune naturel et adaptative. Dans le phénomène d'ACAID, le versant anti-inflammatoire est favorisé par rapport au versant pro-inflammatoire, ce qui empêche la mise en place réaction immune contre un antigène donné, présent dans la chambre antérieure, le vitré ou l'espace sous rétinien. En outre, l'ACAID induit la mise en place d'une tolérance périphérique pour l'antigène donné. Ce mécanisme d'ACAID a été décrit comme induit par la capture de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes F4/80+ de l'œil. Celles-ci mûrissent alors et migrent vers la rate, qui est un organe lymphoïde. Dans la rate, ces cellules F4/80+ interagissent avec différentes classes de cellules immunocompétentes (**figure 8**). Ces interactions complexes ont pour conséquence le développement de lymphocyte T CD4+ régulateurs tolérogènes spécifiques des antigènes introduits dans la chambre antérieure ou l'espace sous rétinien (Gregerson et al., 2009; Medawar, 1948; Taylor, 2009).

Enfin, l'œil et la rétine bénéficient d'un microenvironnement immunosuppresseur, qui est induit par une série de facteurs immunomodulateurs sécrétés ou cellulaires tels que l'IL-10 et B7-CTLA4 (Streilein, 2003; Taylor, 2009). Ainsi, le recrutement et l'activation des cellules immunocompétentes, ainsi que la mise en place de réactions inflammatoires, sont fortement inhibées dans la rétine, et dans l'œil en général. Le caractère immunoprivilégié de l'œil est un avantage majeur pour la thérapie cellulaire et génique dans l'œil, car ceci permet de contourner les réponses immunitaires délétères à la réussite à long terme des stratégies de thérapies géniques *in vivo*.

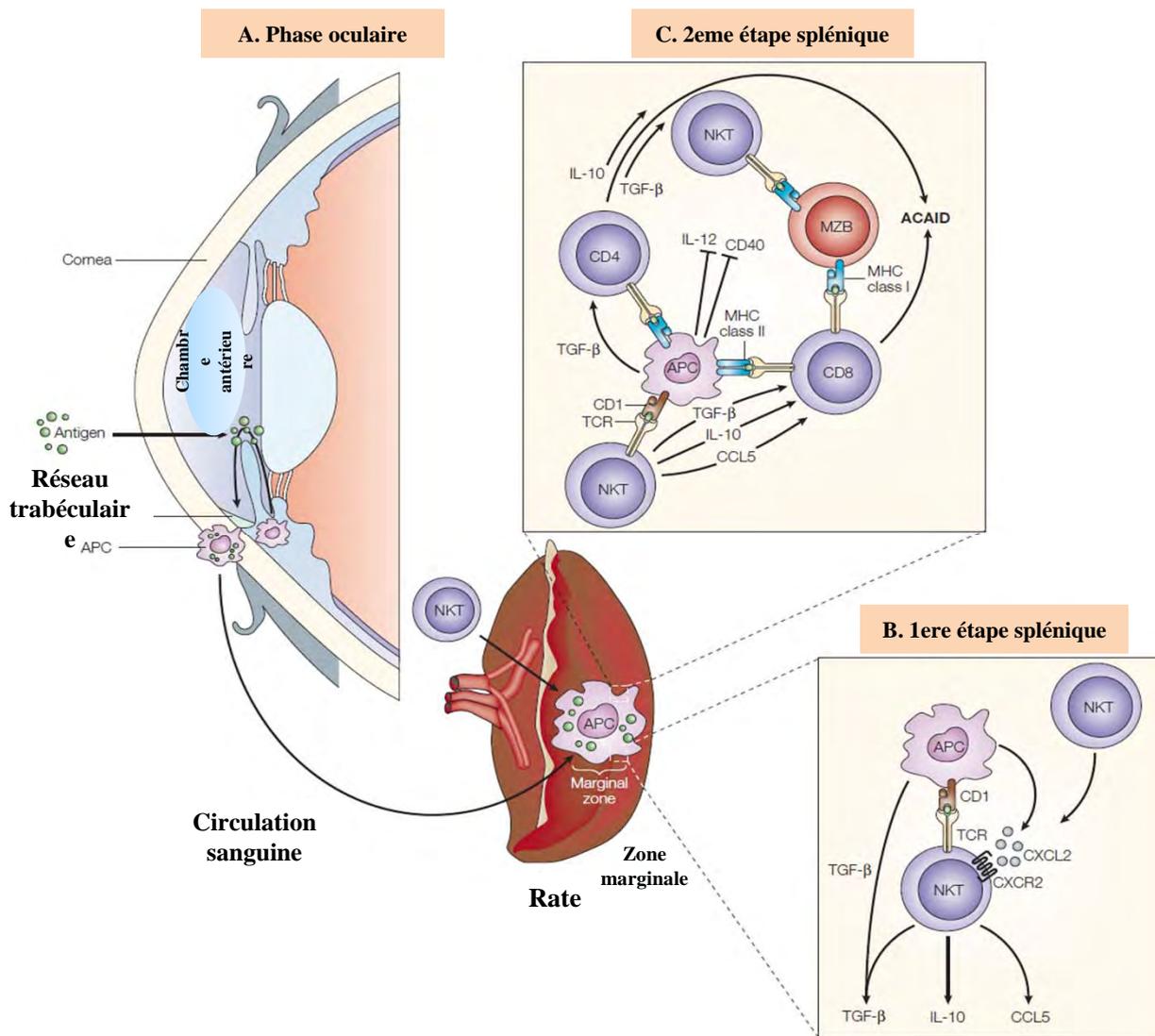


Figure 8. Modèle mécanistique de la réponse immune déviée associée à la chambre antérieure (ACAID) de l’œil.

L’administration intraoculaire d’un antigène peut induire une réponse immunitaire de type tolérogénique, c’est la réponse immune déviée associée à la chambre antérieure ou « Anterior-chamber-associated immune deviation » (ACAID). Celle-ci se déroule en 2 phases: l’une oculaire, et l’autre splénique.

(A) Après administration d’un antigène dans la chambre antérieure de l’œil, le vitré ou l’espace sous-rétinien, celui-ci est capturé par les cellules présentatrices d’antigène F4/80+ (APC) de l’œil. Ces APC vont alors maturer et migrer vers la zone périphérique de la rate par la circulation sanguine.

(B) Au cours de la première étape splénique, les APC recrutent les lymphocytes T Natural Killer (NKT), par sécrétion d’une série de chémokines dont le Transforming Growth Facteur-β (TGF-β) et le CC-chémokine ligand 2 (CXCL2). Le complexe APC/NKT génère un microenvironnement riche en facteurs à action tolérogénique et anti-inflammatoire : la thrombospondine, TGF-β and interleukine-10 (IL-10).

(C) Au cours de la deuxième étape splénique, les APC forment un complexe multicellulaire avec les cellules NKT, les lymphocytes T CD4+ (CD4) et T CD8+(CD8), ainsi que les cellules B de la zone marginale de la rate (MZB). Ce complexe multicellulaire sécrète de nombreux facteurs immuno-modulateurs à action tolérogénique dont IL-10, IL-12, TGF-β, CCL2, CCL5, CD40 ligand (CD40), CCL5. Ceci induit le recrutement des cellules CD4 et CD8 spécifiques de l’antigène introduit dans l’œil, ainsi que la différenciation des CD4 en cellules T régulatrices à action immunosuppressive.

Le bon fonctionnement de la rétine dépend essentiellement de l'intégrité de ses réseaux neuronaux complexes, mais aussi de l'intégrité des différentes structures de l'œil (vascularisation, BHR, vitré, cristallin...). Il en résulte qu'une modification de la structure ou de l'environnement de la rétine, peut avoir des conséquences pathologiques sévères sur la fonction visuelle.

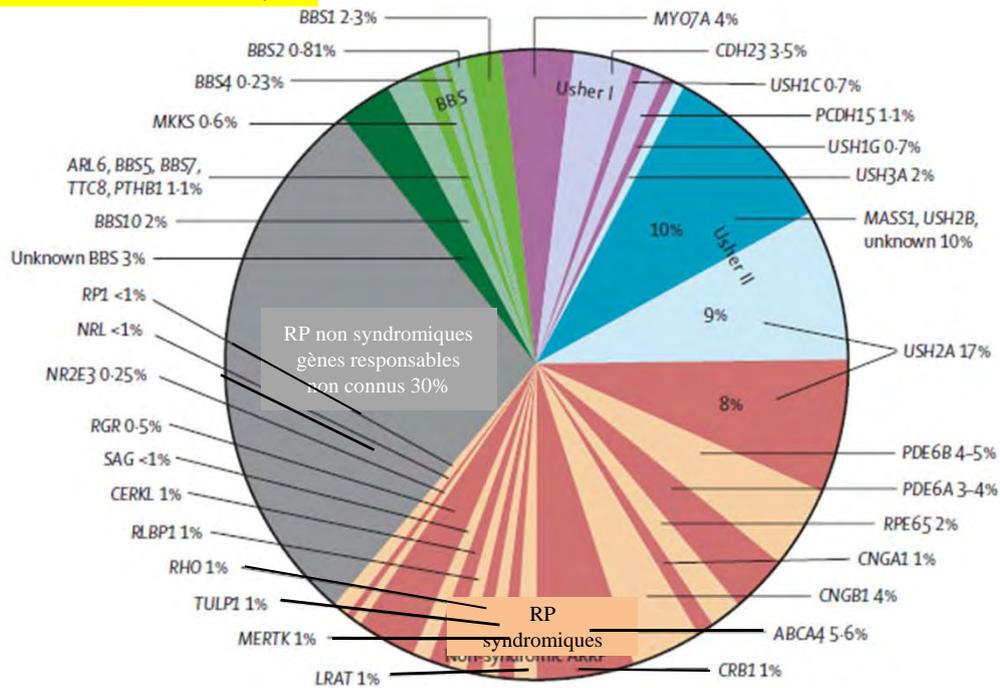
Il existe une grande variété de pathologies affectant l'œil et induisant une perte partielle ou totale de la fonction visuelle, les trois catégories plus fréquentes sont : **(1)** Le dysfonctionnement des photorécepteurs ou des cellules de l'EPR, induisant la dégénérescence de la rétine. **(2)** L'augmentation pathologique de la pression intraoculaire induisant la mort des cellules ganglionnaires. **(3)** La néo-vascularisation pathologique de la rétine (suite à un diabète par exemple) induisant la dégénérescence de la rétine.

Ces diverses pathologies affectent au moins entre 2 et 4 millions de personnes dans le monde (Foster et al., 2008). Dans le chapitre suivant, nous présenterons les maladies génétiques dégénératives de la rétine induisant la perte de la fonction visuelle.

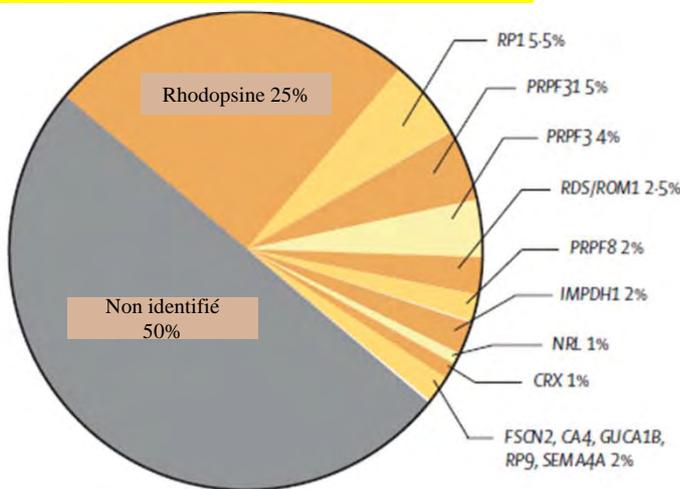
1.4 Les dégénérescences héréditaires de la rétine syndromiques et non syndromiques

Les dégénérescences héréditaires de la rétine (DHR) peuvent avoir pour origines un dysfonctionnement des photorécepteurs, de l'EPR, ou plus généralement du métabolisme cellulaire (Berger et al., 2010). Les DHR affectent plus d'1 individu sur 4000 dans la population mondiale et regroupent un ensemble hétérogène de pathologies dont font partie les rétinites pigmentaires (RP) (Hartong et al., 2006), l'amaurose congénitale de Leber (ACL) (den Hollander et al., 2008), les cônes dystrophies (CD) (Michaelides et al., 2004), et certaines maladies métaboliques (Rajappa et al., 2010). La plupart de ces pathologies sont causées par la mutation d'un seul gène dont beaucoup ont été identifiés (www.sph.uth.tmc.edu/retnet/). Leur mode de transmission peut être autosomique récessif, autosomique dominant, ou liées au chromosome X ou encore d'origine mitochondriale (**figures 9 et 10**). De plus, on distingue les DHR non syndromiques affectant la rétine seule, et les DHR syndromiques affectant la rétine en association avec d'autres organes.

**Les rétinites pigmentaires (RP)
à transmission autosomique récessive
(environ 50-60% de l'ensemble des RP)**



**Les rétinites pigmentaires (RP)
à transmission autosomique dominante
(environ 30-40% de l'ensemble des RP)**



**Les rétinites pigmentaires (RP)
à transmission liées au chromosome X
(environ 5-15% de l'ensemble des RP)**

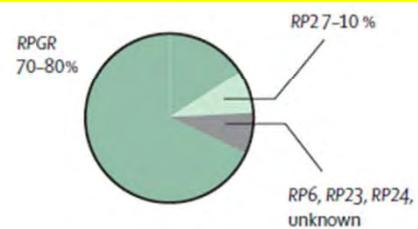


Figure 9. Liste des gènes identifiés comme responsables des dégénérescence héréditaires de la rétine (Rétinites pigmentaires, Amaurose congénitale de Leber et Cône dystrophie) et leur fréquence relative selon leur mode de transmission héréditaire.

Les DHR affectent plus de 2 millions d'individu dans le monde. Les DHR à transmission autosomique récessive sont les plus nombreuses et représentent environ 50 à 60% du total des DHR, tandis que les DHR à transmission autosomique dominante et liées au chromosome X représentent respectivement 30 à 40% et 5 à 15% du total des DHR. Les causes les plus fréquentes de DHR non syndromiques sont les mutations des gènes rhodopsine (*RHO*), *RPGR* avec respectivement 10% et 6% du total des DHR. En outre les mutations des gènes *RHO* et *RPGR* sont respectivement les principales causes des formes autosomiques dominantes (25%) et liées au chromosome X (70-80%). La principale cause de DHR syndromique est le syndrome de Usher, et en particulier les mutations du gène *USH2A* qui représentent environ 8% des DHR totales

Illustrations issues de Hartong 2006 Lancet.

Fonction cellulaire des gènes	Mode de transmission génétique
Cascade de phototransduction	
RHO, rhodopsin (G-protein coupled photon receptor) ¹²⁴	Dominant, recessive
PDE6A, rod cGMP-phosphodiesterase α subunit (G-protein effector enzyme) ^{115,116}	Recessive
PDE6B, rod cGMP-phosphodiesterase β subunit (G-protein effector enzyme) ^{115,116}	Recessive
CNGA1, rod cGMP-gated cation channel α subunit ¹²⁷	Recessive
CNGB1, rod cGMP-gated cation channel β subunit ¹¹⁸⁻¹²⁰	Recessive
SAG, arrestin (rhodopsin deactivation) ¹²¹	Recessive
Métabolisme de la vitamine A	
ABCA4, ATP-binding cassette protein A4 (photoreceptor disc membrane flippase for vitamin A) ^{122,123}	Recessive
RLBP1, retinaldehyde binding protein (11-cis-retinaldehyde carrier) ¹²⁴	Recessive
RPE65, (vitamin A trans-cis isomerase) ^{125,126}	Recessive
LRAT, lecithin retinol acetyltransferase (synthesises vitamin A esters) ¹²⁵	Recessive
RGR, RPE-vitamin A G-protein coupled receptor (photon receptor in RPE) ¹²⁷	Recessive
Cytosquelette ou matrice extracellulaire	
RDS, peripherin (outer disc segment membrane protein) ^{128,129}	Dominant, digenic
ROM1, rod outer segment protein ¹³⁰	Digenic
FSCN2, fascin (actin bundling protein) ^{131,132}	Dominant
TULP1, tubby-like protein 1 ¹³³	Recessive
CRB1, crumbs homologue (transmembrane protein, adherent junctions) ¹³⁴	Recessive
RP1, microtubule-associated protein (microtubule formation and stabilisation) ¹³⁵	Dominant, recessive
Signalisation cellulaire et synaptique	
SEMA4A, semaphorin B, transmembrane immune system protein ¹³⁶	Dominant
CDH23, cadherin 23 (adhesion receptor) ^{137,138}	Recessive
PCDH15, protocadherin 15 (adhesion receptor) ¹³⁹	Recessive
USH1C, Usher's syndrome type 1C (integrating scaffold protein harmonin) ¹⁴⁰	Recessive
USH2A, Usher's syndrome type IIA (Usher's network protein) ¹⁴⁰	Recessive
MASS1, monogenic audiogenic seizure susceptibility 1 (Usher's network protein) ¹⁴⁰	Recessive
USH3A, Usher's syndrome type IIIA (transmembrane protein clarin 1) ¹⁴¹	Recessive
RP2, plasma membrane associated protein ¹⁴²	X-linked
Épissage des ARNm	
PRPF31, precursor mRNA-processing factor 31 (spliceosome component) ¹⁴³	Dominant
PRPF8, precursor mRNA-processing factor 8 (spliceosome component) ¹⁴⁴	Dominant
PRPF3, precursor mRNA-processing factor 3 (spliceosome component) ^{145,146}	Dominant
RP9, PIM1-associated protein (RNA splicing factor) ¹⁴⁷	Dominant
Adressage intracellulaire des protéines	
MYO7A, myosin 7A (melanosome motility protein) ¹⁴⁸	Recessive
USH1G, scaffold protein containing ankyrin repeats and SAM domain (Usher's type I protein traffic regulator) ¹⁴⁹	Recessive

Figure 10A. Liste des gènes identifiés comme responsables de rétinites pigmentaires (RP) selon la fonction cellulaire des protéines codées.
(illustrations issue de Hartong 2006 Lancet).

Fonction cellulaire des gènes	Mode de transmission génétique
Maintenance des cils primitifs	
BBS1, Bardet-Biedl syndrome 1 ¹⁵⁰	Recessive
BBS2, Bardet-Biedl syndrome 2 ¹⁵⁰⁻¹⁵²	Recessive
ARL6, ADP-ribosylation factor like 6 ¹⁵⁰	Recessive
BBS4, Bardet-Biedl syndrome 4 ^{150,153}	Recessive
BBS5, Bardet-Biedl syndrome 5 ^{150,154}	Recessive
MKKS, McKusick-Kaufman syndrome ^{150,155}	Recessive
BBS7, Bardet-Biedl syndrome 7 ^{150,156}	Recessive
TTC8, tetratricopeptide repeat domain 8 ^{150,156,157}	Recessive
PTHB1, parathyroid hormone-responsive B1 gene ¹⁵⁰	Recessive
RPGR, trafficking of proteins in the cilia ^{158,159}	X-linked
Régulation du pH (choriocapillaris)	
CA4, carbonic anhydrase IV (carbon dioxide/bicarbonate balance) ¹⁶⁰	Dominant
Phagocytose	
MERTK, mer tyrosine kinase proto-oncogene (RPE receptor involved in outer segment phagocytosis) ¹⁶¹	Recessive
Autres fonctions	
CERKL, ceramide kinase-like (ceramide converting enzyme) ¹⁶²	Recessive
IMPDH1, inosine-5' monophosphate dehydrogenase type I (guanine nucleotide synthesis) ¹⁶³	Dominant
BBS10, vertebrate-specific chaperonin-like protein ²⁹	Recessive
RPE = Épithélium pigmentaire rétinien	

Figure 10B. Liste des gènes identifiés comme responsables de rétinites pigmentaires (RP) selon la fonction cellulaire des protéines codées.

Illustration issue de Hartong 2006 Lancet.

1.4.1 Les dégénérescences héréditaires non syndromiques de la rétine : physiopathologie et classification clinique.

Cliniquement, les DHR non syndromiques sont hétérogènes dans le type d'atteinte visuelle induite, ainsi que dans la sévérité de leurs atteintes, leurs âges d'apparitions et leurs vitesses de progression. Cependant, toutes ces DHR se caractérisent par une perte bilatérale et progressive de la fonction visuelle avec une diminution progressive de l'acuité visuelle et du champ visuel périphérique et/ou central, ainsi que par une altération de la sensibilité et de l'adaptation à la lumière. De plus l'altération de la motricité oculaire et du réflexe de fixation, est souvent associée à l'altération de la fonction visuelle dans les RP et les ACL. Ce symptôme est appelé nystagmus. L'altération de la fonction électrophysiologique de la rétine peut être mesurée dans toutes ces DHR par un examen extra-oculaire, l'électrorétinogramme (ERG), qui permet de mettre en évidence la diminution de l'activité électrique de la rétine, ainsi que l'origine cellulaire de l'atteinte, que ce soit les cônes ou les bâtonnets ou encore les cellules bipolaires. L'ERG consiste à placer des électrodes extra-oculaires, puis à stimuler le sujet avec des intensités de lumière variable pour pouvoir enregistrer l'activité électrique des bâtonnets et des cônes dans la rétine (Holder, 2001). En outre, ces DHR peuvent aussi s'accompagner d'une altération progressive de la vision des couleurs en particulier dans les « cône dystrophies ». Histologiquement, l'observation directe du fond d'œil révèle la décoloration progressive de la rétine indiquant sa dégénérescence, ainsi que l'accumulation de dépôts de lipofuscine auto-fluorescents dans les cellules de l'EPR, en particulier dans les RP. De plus, l'atrophie progressive de la vascularisation intra-rétinienne peut être mise en évidence par examen du fond d'œil et par angiographie suite à l'administration systémique d'un marqueur fluorescent.

La topographie de la dégénérescence retienne et son évolution, varient d'une forme à l'autre de DHR. Schématiquement, ces dégénérescences peuvent être de type centrifuge – macula puis rétine périphérique - ou centripète – rétine périphérique puis macula. La dégénérescence de la rétine commence systématiquement par l'atrophie des couches des photorécepteurs et de l'EPR, puis s'étend au reste de la rétine. En effet, la cause primaire de la plupart des DHR est la mutation d'un gène exprimé spécifiquement dans les cellules de l'EPR ou les photorécepteurs, ce qui induit leur apoptose.

Les DHR sont classé cliniquement généralement en 3 grandes catégories : (1) les rétinites pigmentaires (RP) qui sont des « rod-cone dystrophies », (2) les amauroses congénitales de Leber (ACL), et (3) les « cône-rod dystrophies ». Ces 3 grandes catégories de DHR se distinguent par le

type de photorécepteur atteints, la précocité et la sévérité des atteintes de la rétine et de la fonction visuelle.

- Les RP affectent environ 1 individu sur 4000, et recouvre un groupe hétérogène de pathologies (Hartong et al., 2006). L'âge auquel débute la dégénérescence de la rétine varie significativement, avec certains patients pouvant être asymptomatique jusqu'à l'âge adulte, tandis que d'autres patients ont perdu la vue au cours de l'adolescence. Cependant toutes les RP sont des « **rod-cone dystrophies** » (RCD) qui se caractérisent par une atteinte initiale des photorécepteurs de type bâtonnet, et plus tard de celle des cônes. De ce fait, ces RCD se traduisent cliniquement d'abord par une altération du champ visuel périphérique et de la vision nocturne, associée à une dégénérescence de la rétine périphérique. Plus tardivement, les patients subissent une altération de l'acuité visuelle, de la vision des couleurs et du champ visuel central, associée à la dégénérescence de la rétine centrale où sont concentrés les cônes.

La plus part des RP est causée par la mutation d'un seul gène parmi les 45 identifiés à ce jours (<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/sum-dis.htm>). Le mode de transmission héréditaire des RP peut être autosomique récessif (50-60%), autosomique dominant (30-40%) ou lié au chromosome X (5-15%) (Hartong et al., 2006). Il existe aussi d'autres formes de transmission héréditaire qui sont plus rares, telles que l'isodisomie uni-parentale, ou encore les modes de transmission digéniques et mitochondriaux. Chacun des gènes identifiés comme impliqués dans les RP, ne représentent généralement qu'un faible nombre de cas de RP (**figures 9 et 10**). Cependant, parmi ceux-ci les gènes rhodopsine, USH2A, et RPGR sont responsables collectivement d'environ 30% de toutes les RP. Les mutations du gène *RHO* induisent environ 25% des cas de RP autosomiques dominantes, tandis que les mutations de USH2A sont responsables de 20% des cas de RP autosomiques récessives, et que les mutations du gène RPGR sont la cause de 70% des cas de RP liées au chromosome X.

Il est intéressant de relever que les gènes responsables des RP sont impliqués le plus souvent dans le développement, la structure, le métabolisme ou la fonction des cellules de la rétine, et en particulier des photorécepteurs et des cellules de l'EPR dans lesquels la cascade de phototransduction ou le cycle des rétinoïdes sont souvent touchés par ces mutations (**figure 10**) (Lorenz et al., 2010). Ainsi le gène *RHO* code pour le photopigment rhodopsine des photorécepteurs de type bâtonnet, et il est impliqué dans la cascade de phototransduction. Les gènes USH2A et RPGR sont quant à eux, impliqués dans le cytosquelette des photorécepteurs, et plus particulièrement dans la fonction et la formation des cils connecteurs des bâtonnets et des cônes.

➤ Les ACL constituent une sous-catégorie clinique des RP et des DHR en générale. Les ACL se caractérisent par une altération très précoce et très sévère de la fonction visuelle, qui s'initie dès la première année de la vie et aboutit généralement à la cécité avant 20 ans (Koenekoop, 2004). La prévalence des ACL est estimée à 1 individu pour 80 000. À ce jour, 15 gènes responsables ont été identifiés LCA5, parmi lesquels les mutations des gènes *CEP290*, *GUCY2D*, *CRB1*, *IMPDH1* et *RPE65* sont premières causes d'ACL identifiées (den Hollander et al., 2008).

Il est intéressant de noter d'une part que la grande majorité des gènes causals des ACL sont exprimés exclusivement dans les photorécepteurs ou les cellules de l'EPR, et d'autre part que la mutation de ces mêmes gènes a été identifiée comme pouvant induire la forme classique des RP, des cône dystrophie ou encore des DHR de type syndromique. Les conséquences cliniques différentes de mutations dans un même gène peuvent s'expliquer par exemple par la sévérité variable des mutations sur l'activité résiduelle des gènes, ou sur l'éventuelle mise en place d'un effet dominant négatif morbide.

Ainsi les mutations des gènes *CEP290*, *RHO* et *RPE65* ont été décrites comme pouvant induire respectivement différentes formes de DHR. Les mutations du gène *CEP290* peuvent engendrer des ACL ou un syndrome de Joubert (Parisi, 2009). Les mutations du gène *RHO* peuvent causer des DHR progressives à transmission autosomiques récessive ou dominante, ou alors à des forme stationnaire de cécité nocturne (Kisselev, 2005). Les mutations du gène *RPE65* peuvent induire des DHR à initiation tardive et à progression lente, ou des formes précoces et à progression très rapide de type ACL Ceci illustre la complexité clinique, physiopathologique et génétique des DHR.

En outre, la thérapie génique pour le traitement des DHR s'est principalement intéressé aux mutations associées aux ACL (Stieger et al., 2010). Récemment, plusieurs essais cliniques de thérapie génique ont eu lieu pour essayer de traiter des patients atteints de mutations du gène *RPE65* et de dégénérescence plus ou moins sévère de la rétine et de la fonction visuelle (cf. 3.1.1).

➤ Les **cône-rod dystrophies** » (CRD) se caractérisent par une atteinte initiale des photorécepteurs de type cône, suivit d'une atteinte des bâtonnets (Michaelides et al., 2006). Leur prévalence est estimé à 1 individu pour 40 000 (Hamel, 2007). Cliniquement, les CRD se traduisent cliniquement par des altérations plus ou moins sévères de l'acuité visuelle, du champ visuel central, ainsi que par une altération de la vision chromatique, une photophobie et un nystagmus. Dans un second temps, les CRD se caractérisent aussi par une altération du champ visuel périphérique, de la vision nocturne.

Les principaux gènes identifiés comme responsables de CRD sont les gènes *ABCA4*, *CNGA3* et *RPGRI1*. Ici aussi, il est intéressant de noter d'une part que la sévérité et la précocité des atteintes cliniques dépendent de la nature des mutations génétiques pour un même gène, et d'autre part que les mutations des gènes *ABCA4* et *CNGA3* peuvent aussi induire d'autres formes de DHR. En effet, les mutations du gène *CNGA3* sont responsables de certaines formes de daltonisme et de « cône dystrophie », tandis que les mutations du gène *ABCA4* peuvent causer une forme de DHR affectant uniquement la macula et dénommé : la maladie de Stargardt (Molday et al., 2009). Cette dernière est à transmission autosomique récessive avec une prévalence estimée de 1 individu pour 10 000. Elle se traduit par une dégénérescence progressive des photorécepteurs et des cellules de l'EPR de la macula chez l'adolescent ou l'adulte, la présence de dépôt auto fluorescent de lipofuscine dans la macula, et par une diminution de l'acuité visuelle et du champ visuel central.

En outre, il existe aussi des formes rares de DHR qui n'affectent que les photorécepteurs de type cône, ce sont les « **cône dystrophies** » (CD) (Michaelides et al., 2004). Les CD sont induites le plus souvent par la mutation de gènes impliqués dans la cascade de phototransduction tels que les gènes *CNGA3* ou encore *GUCY2D* (Michaelides et al., 2006; Michaelides et al., 2004). Les CD sont le plus souvent à transmission autosomique récessives ou liés au chromosome X. Cliniquement, les CD peuvent être de type stationnaire ou induire une dégénérescence progressive de la rétine et de la fonction visuelle. De plus, l'atteintes des photorécepteurs de type cône peuvent affecter une seule ou plusieurs sous-type de photorécepteurs de type cône (rouge, vert, et/ou bleu), et donc induire une cécité pour une seule ou plusieurs couleurs (Simunovic, 2010).

1.4.2 Les dégénérescences héréditaires syndromiques de la rétine.

Les formes syndromiques des DHR représentent environ un tiers de la totalité des DHR (**figure 9**) (Hartong et al., 2006). Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ces différentes maladies varient de façon très significative, de même que la précocité, la sévérité ou les types d'organes atteints. Cependant, parmi ces pathologies héréditaires, on distingue deux grandes catégories de maladies en fonction de la nature de l'atteinte cellulaire : les ciliopathies héréditaires syndromiques et les maladies métaboliques. Seules seront présentés dans ce chapitre les formes les plus fréquentes de ciliopathies et de maladies métaboliques affectant la rétine.

1.4.2.1 Les ciliopathies héréditaires syndromiques

Les ciliopathies se définissent par une altération du développement, de la structure ou de la fonction des cils primitifs présents sur la plupart des cellules de mammifères, tels que les cils connecteurs des photorécepteurs, les stéréocils des cellules ciliées de la cochlée, les flagelles des cellules épithéliales des tubes collecteurs rénaux, ou encore les flagelles des spermatozoïdes (Quinlan et al., 2008; Satir et al., 2010).

Les 3 principales formes de ciliopathies héréditaires syndromiques qui induisent la dégénérescence de la rétine, sont le syndrome d'Usher, le syndrome de Bardet-Biedl, et le syndrome de Joubert (Hartong et al., 2006). Dans ces pathologies, l'altération progressive de la fonction de la rétine est souvent associée simultanément à l'altération de la fonction d'autres organes tels que la cochlée, les reins, le système nerveux central, le foie ou encore l'appareil respiratoire. Ceci a pour conséquence une atteinte de la fonction de ces organes de façon plus ou moins sévères et précoce. Ces différents syndromes ont une fréquence individuelle variant entre 1 et 5 malades pour 100 000 personnes dans la population générale, et ils ont le plus souvent un mode de transmission monogénique autosomique récessif. Chacun de ces syndromes peut être causé par la mutation de plusieurs gènes qui ont été identifiés pour la pluparts (Parisi, 2009; Rooryck and Lacombe, 2008; Saihan et al., 2009).

Le syndrome d'Usher se caractérise souvent par une altération des fonctions visuelles et auditives, et plus particulièrement par la perte de fonction et la dégénérescence progressive des photorécepteurs et de la rétine. Les gènes causant ce syndrome sont impliqués d'une part dans la compartimentalisation des mélanosomes et des phagosomes dans les cellules de l'EPR, d'autre part dans le transport de l'opsine à travers les cils connecteurs des photorécepteurs, et finalement dans le phénomène de mécanotransduction qui permet la conversion des ondes sonores en potentiel électrique par les cellules ciliées de la cochlée (Muller, 2008; Saihan et al., 2009).

Le syndrome de Bardet-Biedl se caractérise presque systématiquement par une atteinte infantile de la fonction visuelle (93% des malades), rénale, intellectuelle, reproductrice, et une altération de la croissance qui aboutit à une obésité fréquente des malades (Rooryck and Lacombe, 2008). Les gènes causant ce syndrome sont impliqués dans la formation ou la fonction des centrosomes et des corps basaux des cils primitifs. La mutation de ces gènes se traduit dans les photorécepteurs, par un déficit de transport en photopigment vers le segment externe, dont la morphologie et la fonction sont alors affectées (Blacque and Leroux, 2006; Rooryck and Lacombe, 2008).

Le syndrome de Joubert et les pathologies associées (JSRD) se caractérisent par des atteintes variables en sévérité de la fonction de l'œil, du foie, des reins, de l'appareil respiratoires, et surtout du système nerveux central (Parisi, 2009). Les atteintes oculaires sont présentes chez environ 30%

des patients, et se caractérisent par des atteintes la motricité oculaire (nystagmus, apraxie oculomotrice) et des dystrophies rétiniennes. Les gènes causant ce syndrome sont impliqués dans la maintenance des centrosomes, des corps basaux et des cils primitifs, ainsi que dans certains processus développementaux (Doherty, 2009).

1.4.2.2 Les maladies métaboliques héréditaires

À ce jour, plus de 5000 maladies métaboliques héréditaires ont été recensées. Elles affectent le métabolisme énergétique, ou le métabolisme des acides aminés, des carbohydrates, des acides gras, des métaux. Parmi ces pathologies, les maladies de surcharge lysosomale et les maladies mitochondriales sont celles qui induisent le plus souvent la dégénérescence de la rétine (Schapira, 2006a; Scriver, 2008).

Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) constituent un groupe hétérogène de pathologies qui sont responsables d'altération précoces, progressives et irréversibles des fonctions oculaires, neurologiques, musculaires, squelettiques, et/ou cardiaques (Meikle et al., 1999). Le mode de transmission des MSL est le plus souvent monogénique autosomique et récessif, avec une prévalence estimée de 1 individu sur 7000.

Les MSL sont causées un dysfonctionnement du métabolisme lysosomal des sucres, des glycoprotéines ou des lipides, et plus précisément par la déficience d'une seule enzyme. Cela se traduit par la carence ou l'accumulation d'un intermédiaire métabolique toxique chez les sujets malades, chez qui on peut observer l'accumulation de macromolécules dans les cellules et dans le milieu extracellulaire. L'importance de ces accumulations intra et extracellulaire de macromolécules est corrélée à l'activité enzymatique résiduelle et à la sévérité des atteintes fonctionnelles. Les atteintes oculaires induites par les MSL, se traduisent souvent par une altération précoce et rapide de la fonction visuelle, dès la première année de la vie (Poll-The et al., 2003; Rajappa et al., 2010).

Les deux catégories de MSL affectant le plus fréquemment la rétine, sont les mucopolysaccharidoses et la maladie de Batten (**figure 11**).

Parmi les différentes formes de mucopolysaccharidoses (MPS), les MPS de types I, II, III et IV sont associées à des atteintes oculaires, en association des atteintes neurologiques, musculaires et cardiaques (**figures 11 et 12**) (Ashworth et al., 2006). Elles ont une prévalence combinée d'environ 1 individu pour 25 000 (**figure 11**). Les atteintes oculaires se caractérisent par la dégénérescence progressive de la rétine et du nerf optiques, une opacification de la cornée, et une altération de la motricité oculaire. Ces formes de MPS se caractérisent histologiquement par l'accumulation

d'inclusions intracellulaires dans les cellules de l'EPR, les cellules ganglionnaires, mais dans les cellules de l'épithélium cornéen, les cellules musculaires, les hépatocytes et les cellules neurales.

La maladie de Batten recouvre une série de pathologies neurodégénératives de l'enfant et de l'adulte, (Goebel and Wisniewski, 2004; Rider and Rider, 1988). Celle-ci se traduit par une atrophie progressive et sévère de l'encéphale, une altération des fonctions cognitives et mentales, des épisodes épileptiques, une dégénérescence progressive de la rétine, des altérations sévères des fonctions motrices, et finalement une mort précoce entre 10 et 30 ans (Haltia, 2006; Mole, 1999). La maladie de Batten se caractérise histologiquement par une accumulation intracellulaire de matériels auto-fluorescents de type lipofuscine dans les lysosomes des cellules rétinienne, encéphaliques, musculaires et lymphocytaires (Bozorg et al., 2009; Rapola and Haltia, 1973). Dans la rétine, cela se traduit par la mort des photorécepteurs, des cellules de l'EPR et ganglionnaires, ainsi que par une dégénérescence du nerf optique, et une atrophie de la vascularisation intra-rétinienne (Bohra et al., 2000; Bozorg et al., 2009).

Les maladies mitochondriales sont causées le plus souvent par une altération de la fonction de la chaîne respiratoire des mitochondries, qui est à la base du cycle de Krebs. Celles-ci se traduisent par une altération du métabolisme énergétique cellulaire, et en particulier des organes dont le métabolisme est fortement aérobie, parmi lesquels on trouve le système nerveux central et périphérique, les muscles squelettiques, et le cœur (Schapira, 2006b). Les maladies mitochondriales affectant la rétine et d'autres organes simultanément, ont une prévalence combinée de 1 à 10 individus pour 100 000. Leur mode de transmission est de type monogénique, dominant et uniquement de la mère vers l'enfant. Le syndrome de Kearns-Sayre et le syndrome de Neuropathie-Ataxie-Rétinite Pigmentaire, qui sont les formes syndromiques les plus fréquentes, affectent simultanément la rétine, la motricité oculaire, le muscle cardiaque, et la coordination motrice (Schapira, 2006b).

Dans la plupart de ces DHR syndromiques ou non-syndromiques, les cellules de l'EPR et les photorécepteurs sont souvent les premières cellules à être affectées dans la rétine. Or, celles-ci assurent les processus biochimiques et électrophysiologiques nécessaires au phénomène de la phototransduction qui est central dans la fonction visuelle. La dégénérescence de ces deux types cellulaires est la cause première et directe dans ces malvoyances, et donc constitue la cible principale de la thérapie génique pour le traitement des DHR. Dans le chapitre 2, nous présenterons les stratégies de thérapie génique applicables à ces pathologies.

Maladies	Protéines déficientes	Individus diagnostiqués†			Incidence ‡ 1 malade pour N individus	Prévalence § 1 malade pour N individus	1 allèle morbidé pour N individus ¶
		Postnatal	Prénatal	Total			
Aspartylglucosaminuria	Aspartylglucosaminidase	2	0	2	2111	2111	726
Cystinosis	Cystine transporter	15	7	22	281	192	219
Fabry disease	α-Galactosidase	36	0	36	117	117	117 000¶
Gaucher disease	β-Glucoceramide	71	3	74	59	57	119
G _{M1} gangliosidosis	β-Galactosidase	10	1	11	422	384	310
Krabbe disease	Galactoceramide	21	9	30	201	141	188
α-Mannosidosis	α-Mannosidase	4	0	4	1056	1056	514
Metachromatic leukodystrophy	Galactose-3-sulfatase	35	11	46	121	92	152
MPS type I (Hurler-Scheie)	α-Iduronidase	38	10	48	111	88	148
MPS type II (Hunter)	Iduronate-2-sulfatase	26	5	31	162	136	136 000¶
MPS type III-A (Sanfilippo A)	Glucosamine-N-sulfatase	33	4	37	128	114	169
MPS type III-B (Sanfilippo B)	α-N-Acetylglucosaminidase	18	2	20	235	211	230
MPS type III-C (Sanfilippo C)	Acetylcoenzyme A:α-glucosaminide-N-acetyltransferase	3	0	3	1407	1407	593
MPS type III-D (Sanfilippo D)	N-Acetylglucosamine-6-sulfatase	4	0	4	1056	1056	514
MPS type IV-A (Morquio A)	N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase	21	4	25	201	169	206
MPS type VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase	17	1	18	248	235	242
MPS type VII (Sly)	β-Glucuronidase	2	0	2	2111	2111	726
Mucopolipidosis type II/III	Phosphotransferase	10	3	13	422	325	285
Multiple sulfatase deficiency	Multiple sulfatase factor, all sulfatases	3	0	3	1407	1407	593
Niemann-Pick disease type A/B	Shingomyelinase	16	1	17	264	248	249
Niemann-Pick disease type C	NPC1	20	0	20	211	211	230
Pompe disease	α-Glucosidase	21	8	29	201	146	191
Sandhoff disease	β-Hexosaminidase, β subunit	10	1	11	422	384	310
Sialic acid storage disease	Sialic acid transporter	7	1	8	603	528	363
Sialidosis	Neuraminidase	1	0	1	4222	4222	1027
Tay-Sachs disease	β-Hexosaminidase, α subunit	19	2	21	222	201	224
Wolman disease	Acid lipase	6	2	8	704	528	363
Total combiné		470	75	545	9.0	7.7	47

MPS : mucopolysaccharidoses

† : Résultats basés sur le diagnostic de maladies génétiques, entre 1980 et 1996, sur 4 222 323 naissances australiennes.

‡ : Incidence calculée en divisant le nombre d'individus diagnostiqués en postnatal par le nombre de naissances.

§ : Prévalence calculée en divisant le nombre d'individus diagnostiqués en prénatal et postnatal, par le nombre de naissances.

¶ : Fréquence allélique calculée en divisant la prévalence par 4 et en calculant la racine carrée

¶ : Fréquence allélique pour gène liée au chromosome X est considérée égale à la prévalence.

Figure 11. Liste des maladies métaboliques héréditaires lysosomales et leur fréquence.

Ce tableau présente les différentes maladies héréditaires de surcharge lysosomale, en fonction de leur fréquence chez les nouveau-nés australiens entre 1980 et 1996.

La totalité de ces maladies affecte environ 1 naissance sur 7700. Les différentes formes de mucopolysaccharidoses (MPS I à MPS 7) affectent quant à elles, environ 1 naissance sur 22 500.

Tableau issu de Mickle 1999 *Journal of American Medical Association*.

Les mucopolysaccharidoses (MPS) : Atteintes cliniques et leurs sévérités dans les différentes formes de MPS

Maladies	Opacification cornéenne	Rétinopathie	Anomalie du nerf optique	Glaucome	Anomalies musculaires	Atteinte du système nerveux central	Atteintes cognitives et mentales	Anomalies cardiaques	Anomalies respiratoires
MPS IH Hurler	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++
MPS IH/S Hurler-Scheie	++	++	++	++	++	+	++	++	++
MPS IS Scheie	+	++	+	+	++	+	+	++	++
MPS II Hunter	+	++	++	+	+	++	++	++	++
MPS IIIA-D Sanfilippo	+	+++	+	+	+	+++	+++	+	+
MPS IV Morquio	+	++	+	+	+++	++	++	+	+
MPS VI Maroteau x-Lamy	+++		++	++	+++	+		++	++
MPS VII Sly	++		++		++	++	++	++	++
MPS IX Natowicz	UNK	UNK	UNK	UNK	+	++		++	++

Sévérités des atteintes : + = faible, ++ = modérée, +++ = sévère, UNK= non déterminée

Figure 12. Atteintes oculaires dans les mucopolysaccharidoses.

Parmi les différentes formes de mucopolysaccharidose (MPS), les MPS de type I, II, III et IV se traduisent, entre autres, par des atteintes oculaires et plus particulièrement par des dégénérescences de la rétine, ainsi que par des atteintes du nerf optique et de la cornée. La prévalence combinée de ces formes de MPS est d'environ 1 individu pour 25 000.

Tableau issu de Ashworth 2006 Survey of Ophthalmology.

2 Le transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs viraux recombinants

2.1. Généralités à propos de la thérapie génique

La thérapie génique est un domaine médical récent, qui a pu émerger grâce à la compréhension croissante de la biologie humaine, des mécanismes physiopathologiques des maladies génétiques humaines, ainsi qu'à la mise au point de techniques expérimentales performantes permettant de modifier le génome des cellules d'intérêt (Friedmann, 1992).

Initialement, la thérapie génique visait à traiter les causes moléculaires et génétiques plutôt que les symptômes des maladies génétiques, pour lesquelles il n'existe pas de traitements conventionnels efficaces qu'ils soient chirurgicaux, pharmacologiques ou enzymatiques (Friedmann and Roblin, 1972). Cependant les possibilités croissantes offertes par la thérapie génique, ont permis progressivement d'étendre ses champs d'application aux maladies acquises telles que les maladies infectieuses, les maladies cardiovasculaires, certaines formes de diabète et d'obésité, les maladies associées au vieillissement affectant le système nerveux central ou périphérique, telles que Parkinson ou Alzheimer, et même à la vaccination (Edelstein et al., 2007; Edelstein et al., 2004; Flotte, 2007; Friedmann, 1993; Mountain, 2000).

La thérapie génique consiste à apporter dans les cellules d'intérêt, du matériel génétique thérapeutique, qui va être le plus souvent une molécule d'ADN ou d'ARN selon la nature du vecteur thérapeutique utilisé. Ce matériel génétique peut coder par exemple pour une protéine déficiente ou un facteur de survie, un ARN interférentiel (si/shRNA) ou un ARN à activité catalytique (ribozyme) afin d'inhiber la traduction d'un ARNm endogène voire d'induire leur dégradation (Grimm, 2009; Lewin and Hauswirth, 2001), un ARN permettant de moduler l'épissage d'un ARNm endogène (Le Roy et al., 2009), ou encore une ADN recombinase (ZincFinger Nuclease) afin de d'éditer le génome (Carroll, 2008). Afin de permettre l'expression de ce matériel génétique, celui-ci se présente classiquement sous la forme d'une cassette d'expression caractérisée par différents éléments génétiques : (1) un promoteur déterminant la force et la spécificité d'expression, (2) un ADN complémentaire codant pour la molécule thérapeutique, (3) une séquence de polyadénylation, et (4) éventuellement des séquences régulatrices présentes dans les séquences introniques, ou dans les séquences non codantes mais transcrites en 5' ou 3' de l'ADN complémentaire (ADNc) dites 5' et 3' UTR.

Ce transfert de gène peut être réalisé au moyen de trois principaux systèmes de transfert de gène. (1) Les vecteurs viraux qu'ils soient dérivés des adénovirus, rétrovirus, ou encore des virus adéno-associés recombinants (cf. sous chapitre 2.2) (Flotte, 2007). (2) Les vecteurs non-viraux tels que les ADN complexés avec des lipides cationiques ou des nanoparticules, les exosomes, ou certains

microorganismes (Park et al., 2006; Seow and Wood, 2009). (3) Les méthodes physiques telles que les ADN plasmidiques associés à l'électrolocation, le « gene gun », et l'injection hydrodynamique loco régionale (Wells, 2004).

On distingue 4 grandes stratégies de thérapies géniques qui ne sont pas exclusives les unes des autres (**figure 13**) :

- La thérapie génique *in vivo* consiste à injecter le vecteur thérapeutique directement dans les organes malades, par exemple la rétine, afin d'apporter le matériel génétique thérapeutique dans toutes les cellules d'intérêts. Cette stratégie *in vivo* est potentiellement applicable à toutes les pathologies génétiques, si tant est que les organes affectés soient accessibles au transfert de gène, et qu'il existe un vecteur permettant une bonne efficacité de transfert de gène dans ces organes. Cependant, cette stratégie suppose souvent l'administration d'une forte dose de vecteur thérapeutique chez le sujet, par exemple dans le cas de pathologie musculosquelettique ou métabolique. Ceci peut être à l'origine de phénomènes de toxicités associés au vecteur lui-même (cytotoxicité, tumorigenèse et réaction immunitaire) ou à sa dissémination dans l'organisme (transduction des gamètes ou d'embryon). Cependant, la thérapie génique *in vivo* dans la rétine permet de cibler les cellules d'intérêt, avec une faible dose de vecteur thérapeutique, et de limiter sa dissémination en dehors de l'œil, car celui-ci est relativement bien isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-oculaire.
- La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever des cellules souches ou progénitrices du sujet malade, par exemple les cellules souches hématopoïétiques, puis de réaliser le transfert de gène thérapeutique *in vitro* dans ces cellules afin de corriger un défaut génétique. Ces cellules sont ensuite réimplanter pour que ces cellules génétiquement modifiées puissent proliférer et induire un effet thérapeutique chez le sujet. Cette stratégie présente plusieurs avantages : le transfert de gène réalisé *in vitro* est très efficace et ne nécessite que peu de vecteur et peu de cellules. En outre, cette stratégie permet de sélectionner les cellules transduites, et de les amplifier avant de les greffer pour maximiser l'efficacité du transfert de gène. Cependant, cette stratégie n'est applicable principalement qu'aux maladies sanguines chez l'adulte, et pas aux maladies affectant les organes solides tels que la rétine, le muscle, ou le foie.
- La thérapie génique de complémentation ou d'addition consiste à apporter une copie fonctionnelle d'un gène muté dans les cellules d'intérêt, sans corriger la mutation génétique présente dans le génome des cellules malades. Cette stratégie est applicable aussi bien aux stratégies de thérapie génique *in vivo* que *ex vivo*, cependant seules les maladies génétiques à mode de transmission récessive peuvent bénéficier de cette approche par complémentation.

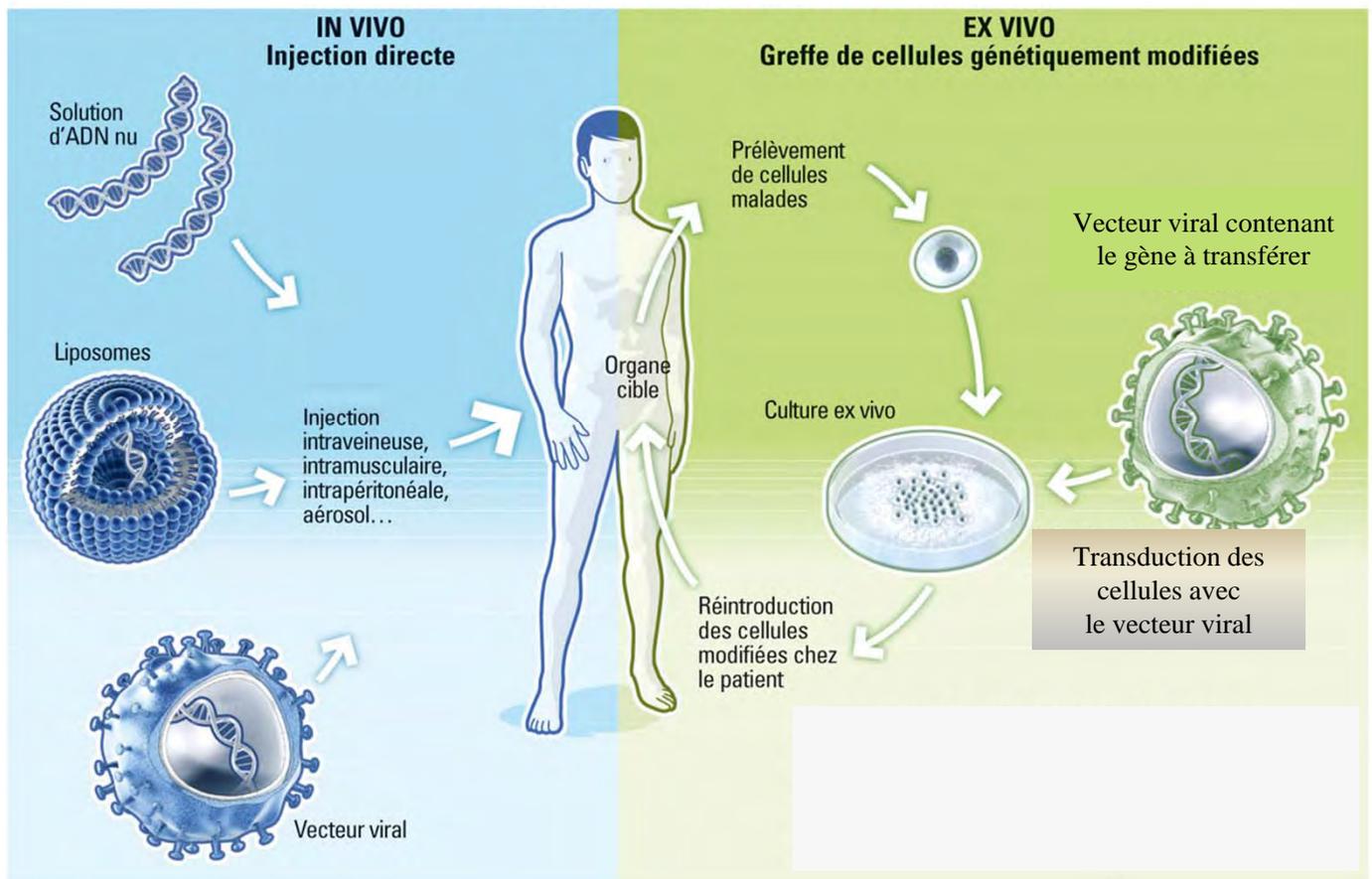


Figure 13. Schéma illustrant les stratégies de thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*.

Les 2 grandes stratégies de thérapie génique, *in vivo* et *ex vivo*, se distinguent par leur mode d'administration du gène thérapeutique chez le patient. Dans ces deux stratégies, le gène thérapeutique, qui induit la correction du phénotype pathologique, est intégré dans un vecteur recombinant qu'il soit d'origine virale (vecteur viral) ou non virale (liposome et ADN nu).

La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever des cellules progénitrices chez le patient malade, puis à réaliser un transfert de gène *in vitro* dans les cellules du patient pour y intégrer le gène thérapeutique, et finalement à greffer ces cellules modifiées chez le patient. Ces cellules modifiées pourront ainsi exprimer le gène thérapeutique dans le corps du patient pour y corriger le phénotype pathologique.

La thérapie génique *in vivo* consiste à administrer le vecteur thérapeutique directement dans le corps du patient, généralement en ciblant directement les cellules malades afin de corriger le phénotype pathologique.

Illustration issue du Journal du CNRS, N°202, Novembre 2006 (<http://www2.cnrs.fr/journal/3131.htm>)

- La thérapie génique de correction consiste à corriger la mutation génétique présente dans le génome des cellules malades. Cette stratégie correctrice est particulièrement adaptée aux maladies génétiques à transmission dominante dans lesquelles la mutation génétique induit un gain de fonction délétère qui ne peut pas être traité en apportant dans les cellules malade une copie fonctionnelle du gène muté. Cependant, cette stratégie est techniquement beaucoup plus difficile à mettre au point.

Le choix de la stratégie thérapeutique est déterminé pour chaque pathologie en fonction de la nature de la mutation génétique, des cellules et les organes à cibler, et du type de vecteur utilisé pour réaliser ce transfert de gène.

Ce manuscrit traitera uniquement de la thérapie génique *in vivo* à l'aide des vecteurs viraux. À ce jour, cette combinaison constitue l'approche la plus efficace et la pertinente pour réaliser un transfert de gène thérapeutique dans les cellules de la rétine, en particulier en clinique humaine. D'une part, l'œil et la rétine sont facilement accessibles pour réaliser *in vivo* des injections de vecteurs thérapeutiques, et pour réaliser les examens anatomiques et électrophysiologiques pour évaluer le succès de ces stratégies thérapeutiques. D'autre part, le transfert de gène dans la rétine est facilité par le nombre relativement faible de cellules à traiter et leur compaction dans l'œil, et surtout dans la rétine. Enfin, la rétine est enfermée dans l'œil, qui est un organe immunoprivilégié, ce qui limite les phénomènes d'immunotoxicité associés au vecteur et au transgène thérapeutique.

Au cours de la dernière décennie, la thérapie génique pour le traitement des maladies génétiques a connu plusieurs succès majeurs, dont la plupart ont porté sur le traitement de maladies d'immunodéficience congénitale (Aiuti et al., 2002; Blaese et al., 1995; Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2006; Gaspar et al., 2004; Ott et al., 2006). Parmi ces succès cliniques, le traitement des enfants atteints de la mutation SCID-X1 a montré pour la première fois la réalité des bénéfices thérapeutiques majeurs que l'on peut attendre de la thérapie génique pour le traitement des maladies génétiques (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004). Les enfants porteurs de cette mutation ont un système immunitaire affaibli suite à un déficit en lymphocytes T (LT). Ce déficit en LT est causé par la mutation du gène codant pour la chaîne α des récepteurs cellulaires impliquée dans la reconnaissance des interleukines IL 2, 4, 7, 9, 15 et IL21. Or ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques, et sont nécessaires à la production de LT matures et fonctionnels. Ainsi, les groupes des Pr Fischer et Trascher, ont réalisé un transfert de gène *ex vivo* les cellules souches hématopoïétiques des enfants malades pour y apporter un copie fonctionnel du gène déficient, à l'aide d'un vecteur intégratif rétroviral. Les enfants traités ont montré une restauration de leur fonction immunitaire, et 10 ans après le traitement, ils sont toujours capables de vivre de façon normale, en dehors d'un environnement confiné.

Récemment, la thérapie génique clinique a aussi été évaluée avec succès pour le traitement de la rétinite pigmentaire associée à la mutation du gène *RPE65* (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b). *RPE65* code pour une enzyme du cycle des rétinoïdes, exprimée uniquement dans les cellules de l'EPR. La déficience de cette enzyme dans la rétine entraîne la perte progressive et précoce de la fonction visuelle (avant 6 ans), et aboutit à la cécité totale des patients vers 30-40 ans. Dans ces études, un vecteur AAVr porteur d'une copie fonctionnelle du gène *RPE65* a été produit. Ce vecteur a été ensuite injecté en intraoculaire, chez 18 patients âgés entre 8 et 26 ans, présentant des atteintes avancées de la fonction visuelle, et une dégénérescence plus ou moins avancée de la rétine. Dans deux de ces études, l'injection du vecteur AAVr s'est traduite par un effet thérapeutique significatif sur la fonction visuelle, mais pas à sa restauration complète. En effet, plusieurs patients traités ont montré une amélioration de leur sensibilité à la lumière, de la taille de leur champ visuel, ainsi qu'une augmentation de leur acuité visuelle (Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b). En outre, aucun effet toxique associé au traitement n'a été relevé et parmi les patients traités, deux individus de 8 (CH08) et 19 ans (Patient 3) ont récupéré une fonction ambulatoire partielle (Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2009).

Ainsi, ces études ouvrent la voie à la thérapie génique dans l'œil pour le traitement des autres DHR, et en particulier pour les formes non syndromiques affectant les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

2.2 Les vecteurs viraux recombinants

Au cours de ce chapitre, nous présenterons uniquement les principaux types de vecteurs viraux recombinants, car ce sont les seuls à permettre un transfert de gène efficace *in vivo*, entre autre dans la rétine.

2.2.1 Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés

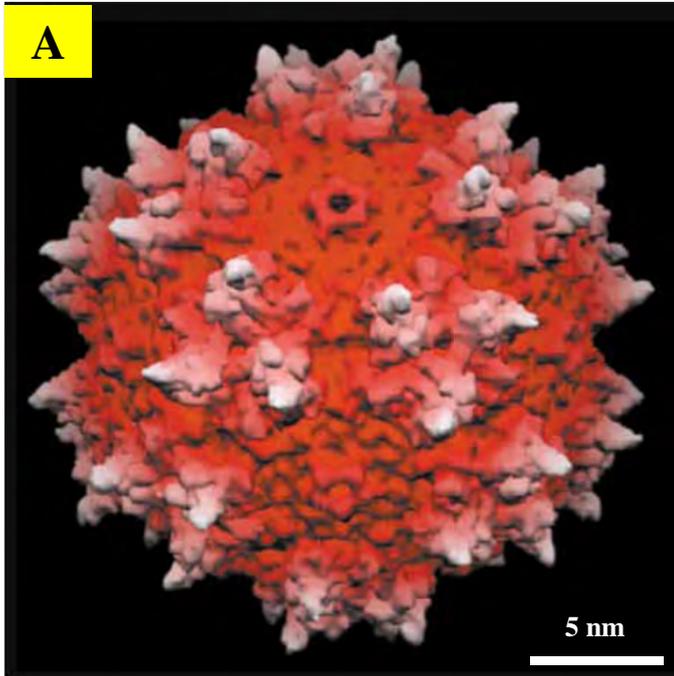
2.2.1.1 Les virus adéno-associés sauvages

Les virus adéno-associés (AAV) sont des virus non enveloppés, à ADN simple brin appartenant à la famille des *parvoviridae* et au genre des dépendovirus. Les AAV sauvages sont des virus faiblement intégratifs, mais non lytiques et non pathogènes pour l'homme. Ils infectent une grande variété de cellules mitotiques et quiescentes, mais sont dépendants d'un virus helper pour leur réplication, tel que l'adénovirus ou le virus de l'Herpes (Berns, 1990). À ce jour, plus d'une centaine de variants génétiques ont été isolés (Chen et al., 2005; Gao et al., 2004; Gao et al., 2005; Mori et al., 2007).

La capsid des AAV est de forme icosaédrique et d'un diamètre de 20 à 25 nm, pour environ 4 MDa (**figure 14**) (Hueffer and Parrish, 2003; Parrish, 2010). La capsid est constituée des protéines virales VP1, VP2 et VP3 selon le ratio 5-5-50. Le tropisme des différents sérotypes d'AAV est déterminé principalement par les domaines en boucle des protéines VP1, VP2 et VP3 (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003). Leurs récepteurs cellulaires ont été partiellement identifiés (**figure 15**), et sont pour certains exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules de mammifères, tel que le protéoglycane héparane sulfate pour l'AAV de sérotype 2 (AAV2) (Schultz and Chamberlain, 2008). Le mécanisme d'entrée cellulaire des AAV est schématisé **figure 16**. Classiquement, l'adhésion cellulaire des virions est induite par la reconnaissance d'un ou plusieurs récepteurs cellulaires selon le sérotype de l'AAV. L'adhésion cellulaire induit l'internalisation du virion par endocytose. L'AAV passe ainsi dans l'endosome précoce, puis dans l'endosome tardif. L'acidification de l'endosome tardif induit la trans-conformation de la capsid, ce qui induit l'échappement de l'AAV vers le cytoplasme. Les particules AAV sont ensuite transportées activement vers le noyau, grâce à leurs interactions avec le cytosquelette, et plus particulièrement avec les molécules de dynéines et le réseau de microtubules cellulaires. Les AAV pénètrent dans le noyau *via* les pores nucléaires. Dans le noyau, les AAV sont décapsidés, et le génome viral est libéré. Après réplication du génome viral, celui-ci reste sous forme latente, jusqu'à ce qu'un virus helper réactive le provirus et induise la production de virion.

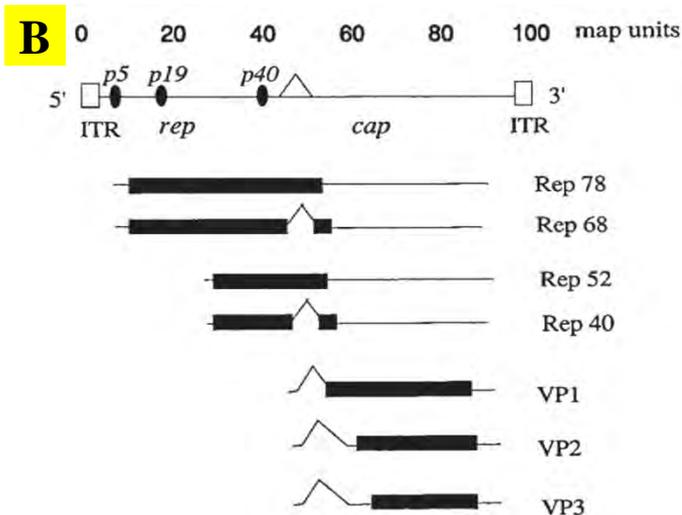
Le génome de l'AAV est une molécule d'ADN simple brin qui peut être de polarité positive ou négative, et dont la taille est d'environ 5 Kb (**figure 14**) (Berns and Adler, 1972; Flotte and Berns, 2005; Srivastava et al., 1983). Le génome simple brin de l'AAV est converti en double brin dans le noyau de la cellule hôte, puis il est circularisé et éventuellement concatémérisé. Le génome des AAV persiste ensuite sous forme soit épisomique, soit intégrée préférentiellement dans le chromosome 19 au niveau du locus AAVS1 (Kotin et al., 1990; Linden et al., 1996a; Linden et al., 1996b; Smith, 2008).

Le génome de l'AAV porte deux régions codantes *REP* et *CAP* (**figure 14**) (Berns, 1990). *REP* code pour les diverses protéines nécessaires à la réplication du génome viral, la régulation des gènes viraux, et son intégration dans le génome cellulaire (Flotte and Berns, 2005). Alors que le gène *CAP* code pour les trois protéines de la capsid VP1, VP2 et VP3. En outre, le génome des AAV est flanqué aux extrémités 5' et 3' par une séquence terminale inversée répétée palindromique de 145pb. Ce sont les ITR qui sont essentiels à l'encapsidation du génome virale, sa réplication, sa circularisation, et son intégration dans le génome de la cellule hôte (Flotte and Berns, 2005).



(A) La structure tridimensionnelle de la capside de l'AAV de sérotype 2.

Celle-ci a été déterminée par cryomicroscopie électronique, puis modélisée par informatique. La taille de capside est d'environ 22 nm de diamètre. La surface de la capside apparaît de forme sphéroïde, avec des protrusions de petite tailles qui sont représentées en clair.



(B) Schéma de l'organisation génomique de l'AAV.

Celui-ci est constitué d'une molécule d'ADN simple brin et linéaire, de polarité positive ou négative, et dont la taille est d'environ 4,7 Kb. Le génome de l'AAV est flanqué aux extrémités 5' et 3' par une petite séquence palindromique de 145pb dite ITR (Inverted Terminal Repeat).

Le génome de l'AAV porte 2 régions codantes multicistroniques : les gènes *Rep* et *Cap*. Le gène *Rep* code pour les protéines régulatrices Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40, par épissage alternatif. Le gène code pour les protéines de la capside CP1, VP2 et VP3, par épissage alternatif.

Figure 14. Représentation de la capside et du génome du virus adéno-associé sauvage (AAV).

Illustrations issues du Hueffer and Parrish 2003 Current Opinion in Microbiology (A) et Flotte and Berns 2005 Human Gene Therapy (B)

Sérotypes	Hôtes	Récepteurs cellulaires
AAV1	Primate	α -2,3 N-acides sialiques α -2,6 N-acides sialiques
AAV2	Humaine	Protéoglycane héparane sulfate Intégrine α v β 5 Récepteur 1 au Facteur de croissance fibroblastique (FGF) Récepteur 2 au facteur de croissance hépatocytaire (HGF) Récepteur de la lamine 37/67-kDa
AAV3	Humaine	Récepteur de la lamine 37/67-kDa
AAV4	Humaine	α -2,3 O-acides sialiques
AAV5	Humaine	α -2,3 N-acides sialiques α -2,6 N-acides sialiques Récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF- α et PDGF- β)
AAV6	Humaine	α -2,3 N-acides sialiques α -2,6 N-acides sialiques
AAV7	Humaine	Non déterminé
AAV8	Humaine	Récepteur de la lamine 37/67-kDa
AAV9	Humaine	Récepteur de la lamine 37/67-kDa
AAV10	Simienne	Non déterminé
AAV11	Simienne	Non déterminé
AAV12	Simienne	Non déterminé

Figure 15. Liste des 12 vecteurs adéno-associés d'origine humaine et simienne, clonés et caractérisés à ce jour, et les récepteurs cellulaires de surface permettant leur adhésion cellulaire.

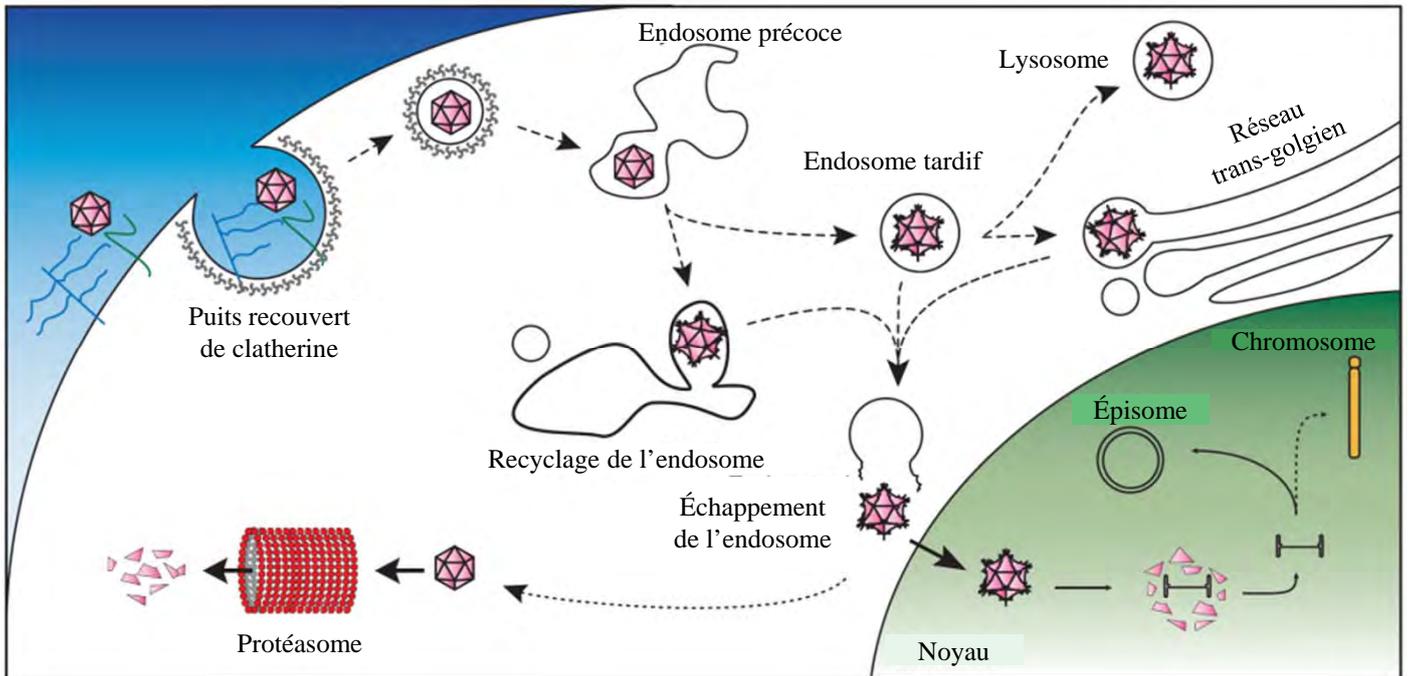


Figure 16. Schéma du mécanisme d'entrée cellulaire du virus adéno-associé (AAV), et de son transport intracellulaire vers le noyau cellulaire.

L'entrée de l'AAV dans la cellule est conditionnée par l'adhésion de la capsid sur une protéine cellulaire de surface telle que le protéoglycane, puis par endocytose induite par ces récepteurs.

Le transport intracellulaire de l'AAV vers le noyau cellulaire est décrit classiquement comme via l'endosome précoce, puis tardif. L'AAV est ensuite libéré par l'endosome tardif au cours de son acidification. Le transport des particules AAV libérées dans le cytoplasme vers le noyau est permis par l'interaction avec le réseau de microtubules. L'AAV entre ensuite dans le noyau via les pores nucléaires.

En parallèle à cette voie de transport intracellulaire, les AAV peuvent être transportés à partir des endosomes vers le lysosome ou l'appareil de Golgi. De plus, les particules AAV libérées dans le cytoplasme, peuvent être ubiquitinylées et dégradées par le protéasome.

Dans le noyau, les particules virales sont décapsidées et le génome simple brin de l'AAV est libéré pour être converti en ADN double brin et pour être circularisé et concatémérisé. Le génome de l'AAV persiste dans le noyau cellulaire essentiellement sous forme d'épisome, ou sous forme intégrée dans le génome de la cellule hôte dans moins de 20% des cas.

Illustration issue de Schultz and Chamberlain 2008 Gen Ther review.

2.2.1.2 Les vecteurs viraux recombinants adéno-associés

Les vecteurs viraux dérivés des AAV (AAVr) ne conservent du génome viral que les ITR nécessaires à l'encapsidation du génome recombinant et à sa conversion double brin (**figure 17**). Les séquences *REP* et *CAP* sont remplacées par la cassette d'expression transgénique, permettant ainsi une capacité cargo maximum d'environ 4,7Kb (Grieger and Samulski, 2005; McLaughlin et al., 1988; Wu et al., 2010). La plupart des vecteurs rAAV sont dit pseudotypés, c'est-à-dire produit à l'aide des ITR de l'AAV2, mais encapsidés dans une capsid de sérotype différent (Rabinowitz et al., 2002). À ce jour, plus de 12 sérotypes de vecteurs rAAVr naturels d'origines humaines, simiennes ou encore porcines, ont été clonés et caractérisés pour le transfert de gène (Arbetman et al., 2005; Bello et al., 2009; Bossis and Chiorini, 2003; Gao et al., 2004; Gao et al., 2005; Gao et al., 2002; Klimczak et al., 2009; Mori et al., 2004; Schmidt et al., 2006). Les différents sérotypes d'AAV se différencient entre eux par la structure primaire et tertiaire de leur capsid, ainsi que par la proximité génétique de leur génome qui varie entre 50 et 90%. Chaque sérotype se définit aussi par une sensibilité importante vis-à-vis des anticorps générés directement contre lui-même, mais par une sensibilité faible contre les anticorps générés contre les autres sérotypes d'AAV connus. Ainsi, seul les anticorps générés contre un sérotype donné, peuvent induire un effet neutralisant important sur celui-ci. La capacité de neutralisation des anticorps correspond à la capacité de certains anticorps à inhiber la transduction cellulaire par l'AAVr (Gao et al., 2005).

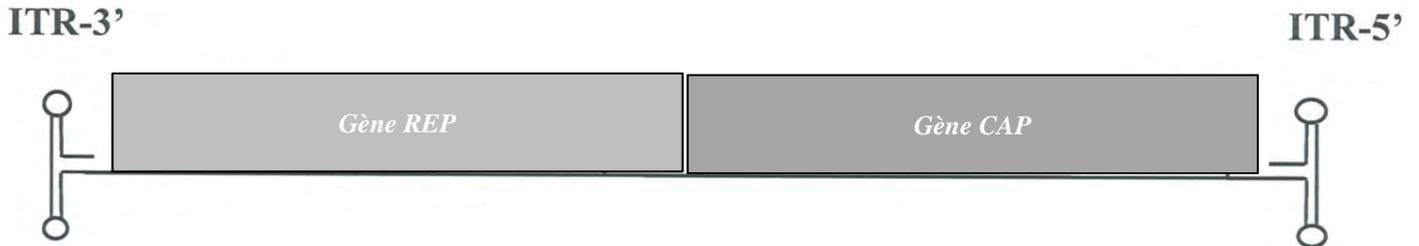
Les AAVr sont très largement utilisés dans les études de thérapie génique expérimentale (Warrington and Herzog, 2006) et clinique (Coura Rdos and Nardi, 2007; Mueller and Flotte, 2008). Les AAVr présentent de nombreux avantages :

- Le tropisme des AAVr est très large. Individuellement de chaque sérotypes d'AAVr permet généralement de cibler efficacement *in vivo* un nombre réduit d'organes ou de types cellulaires, mais collectivement leur tropisme couvrent la presque totalité des organes et des types cellulaires de l'organisme. Ainsi, les vecteurs AAVr offrent une grande flexibilité en transfert de gène *in vivo* (**figure 18**). Leur tropisme et leur efficacité à produire un transfert de gène a été évalué avec succès dans un grand nombre d'organes parmi lesquels le cerveau (Davidson et al., 2000; Hadaczek et al., 2010; McCown et al., 1996), les muscles squelettiques et cardiaques (Herzog et al., 1999; Kessler et al., 1996; Toromanoff et al., 2010), ou encore le foie (Herzog et al., 1999; Niemeyer et al., 2008; Snyder et al., 1997). Dans la rétine, différentes études ont montré que tous les types cellulaires composant la rétine peuvent être transduits efficacement en choisissant le

sérotype optimale en fonction des cellules ciblées (cf. sous chapitre 2.3.1) (Surace and Auricchio, 2008).

- En outre, ces différentes études ont montré la capacité des AAVr à induire un haut niveau d'expression du transgène dans les différents organes étudiés, et ceci à long terme, que ce soit chez la souris (Kessler et al., 1996), le chien (Niemeyer et al., 2008) ou le primate (Hadaczek et al., 2010).
- Les vecteurs AAVr ne sont pas intégratifs en l'absence des protéines virales Rep68 et Rep78 (Smith, 2008). Le génome des AAVr persiste donc essentiellement dans le noyau sous forme épisomique, et ne présente pratiquement pas de risques de mutation insertionnelle, à l'inverse des vecteurs rétroviraux. L'innocuité de ces vecteurs AAVr a été montrée sur le long terme, au cours d'essais précliniques et cliniques (Acland et al., 2005; Christine et al., 2009; Cunningham et al., 2008; Hadaczek et al., 2010; Maguire et al., 2008b).
- Les vecteurs AAVr sont considérés comme faiblement immunogènes. Dans l'œil, et plus particulièrement dans la rétine, l'injection de vecteur rAAV est très bien tolérée et n'induit qu'une faible réponse immune transitoire. Ainsi, Amado et coll. et Simonelli et coll. ont montré récemment que l'injection sous rétinienne de vecteur AAV2, respectivement chez le chien et l'humain, n'induit pas de réponse immune contre le transgène mais une légère augmentation de la concentration sérique des anticorps neutralisant anti-AAV2, et plus rarement une réponse cellulaire LT CD8+ contre la capsid AAV2 (Amado et al., 2010; Simonelli et al., 2010). Ceci est aussi expliqué par le caractère immunoprivilégié de l'œil, et par la mise en place d'une réponse immunitaire déviée vis-à-vis des vecteurs rAAV et de certains transgènes (ACAID) (Anand et al., 2002; Forrester et al., 2008; Streilein, 2003). Ces réactions immune ne sont pas délétères pour l'expression à long terme du transgène dans la rétine, ni pour la ré-administration du vecteur dans l'œil controlatéral chez un sujet préalablement traité (Li et al., 2008a; Li et al., 2009).

Génome de l'AAV sauvage



Génome de l'AAV recombinant

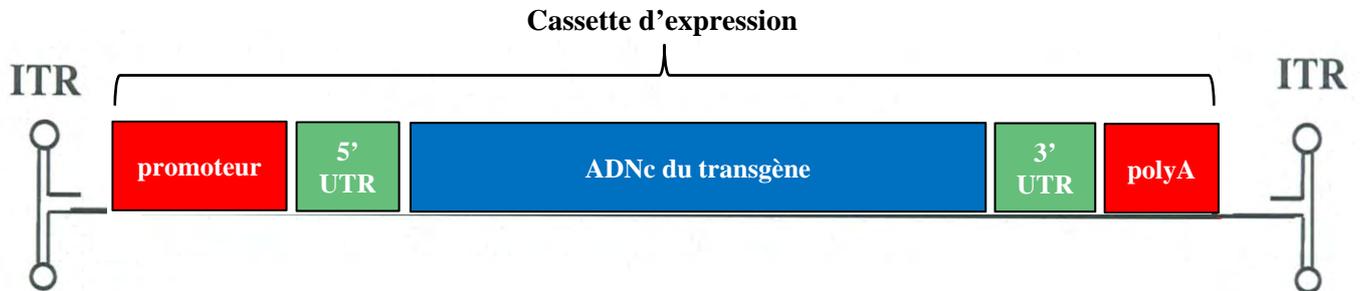


Figure 17. Schéma de l'organisation génomique des AAV sauvages et des vecteurs AAV recombinants.

Les vecteurs adéno-associés recombinants (AAV_r) sont obtenus en remplaçant les gènes viraux *Rep* et *Cap*, par une cassette d'expression. Les vecteurs AAV_r ne conservent du génome viral que les séquences inversées répétées, les Inverse Terminal Repeat (ITR). Les ITR sont nécessaires à la production des vecteurs viraux recombinants, ainsi qu'à leur expression dans la cellule hôte transduite. La taille maximale de la cassette d'expression est de 4,7Kb

La cassette d'expression est classiquement constituée d'un promoteur, de l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour le transgène, et d'une séquence de polyadénylation (polyA).

En outre, la cassette d'expression des séquences non traduites situées en 5' et 3' de l'ADNc, dites 5'UTR et 3'UTR pour « Untranslated Region ». Les séquences 5'UTR et 3'UTR peuvent comporter des éléments génétiques régulateurs de la transcription ou de la traduction, telles que les séquences cibles pour les micro-ARN (miRNA).

Tissus	Sérotype(s) performant(s)
Rétine : photorécepteurs	2 – 5 – 7 – 8 - 9
Rétine : épithélium pigmentaire rétinien	2 – 4 - 5 – 7 – 8 – 9
Système nerveux central	1 – 4 – 5 – 7 – 8 – 9 – 10
Muscles squelettiques	1 – 6 – 7 – 8 – 9
Muscle cardiaque	6 – 8 – 9
Foie	2 – 8 – 9
Poumons	5 – 6 – 9
Pancréas	1 – 8 – 9
Rein	2 – 9

Figure 18. Liste des principaux organes ciblés en transfert de gène thérapeutique et des sérotypes permettant leur transduction efficace.

Cependant ces vecteurs AAVr présentent aussi plusieurs inconvénients pour le développement de certains protocoles de thérapie génique, dans la rétine ou dans d'autres organes :

- La capacité cargo des vecteurs AAVr ne permet pas de transporter une cassette d'expression dont la taille est supérieure à 4,7Kb (Wu et al., 2010). Ceci exclu donc l'utilisation des vecteurs AAVr pour traiter par exemple la maladie de Stargardt, qui est une forme de DHR, et dont le traitement nécessiterait d'apporter dans les photorécepteurs une copie fonctionnelle du gène *ABCA4* dont l'ADNc mesure 7 Kb. En outre, la capacité cargo restreinte des vecteurs AAVr limite aussi l'intégration dans la cassette d'expression des promoteurs endogènes entiers qui font souvent plusieurs milliers de pb.
- L'efficacité de transduction des vecteurs AAVr est moindre comparée à celles d'autres vecteurs viraux. Les AAVr ont une bonne efficacité de transduction pour des ratios « vecteurs AAVr sur cellules ciblées », égale ou supérieur à 10^2 - 10^6 vg/c (vecteur génome/cellule) (Bertran et al., 1996; Maeda et al., 1998). A l'inverse, les vecteurs viraux dérivés des adénovirus et des rétrovirus ont une bonne efficacité de transduction pour des ratios égaux ou inférieurs à 10 vg/c.

En effet, l'étude du cycle viral de l'AAV sauvage a mis en évidence plusieurs étapes cellulaires limitantes, qui affectent aussi l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr. Ainsi, l'entrée cellulaire de l'AAV, la sortie des particules virales de l'endosome vers le cytoplasme, leur décapsidation dans le noyau, et finalement la conversion du génome viral en ADN double brin, constituent des étapes à faible efficacité qui réduisent drastiquement la proportion des virions qui pourront s'exprimer dans le noyau de la cellule hôte (Seisenberger et al., 2001) (Suikkanen et al., 2003) (Thomas et al., 2004) (Ferrari et al., 1996; Fisher et al., 1996; Sipo et al., 2007).

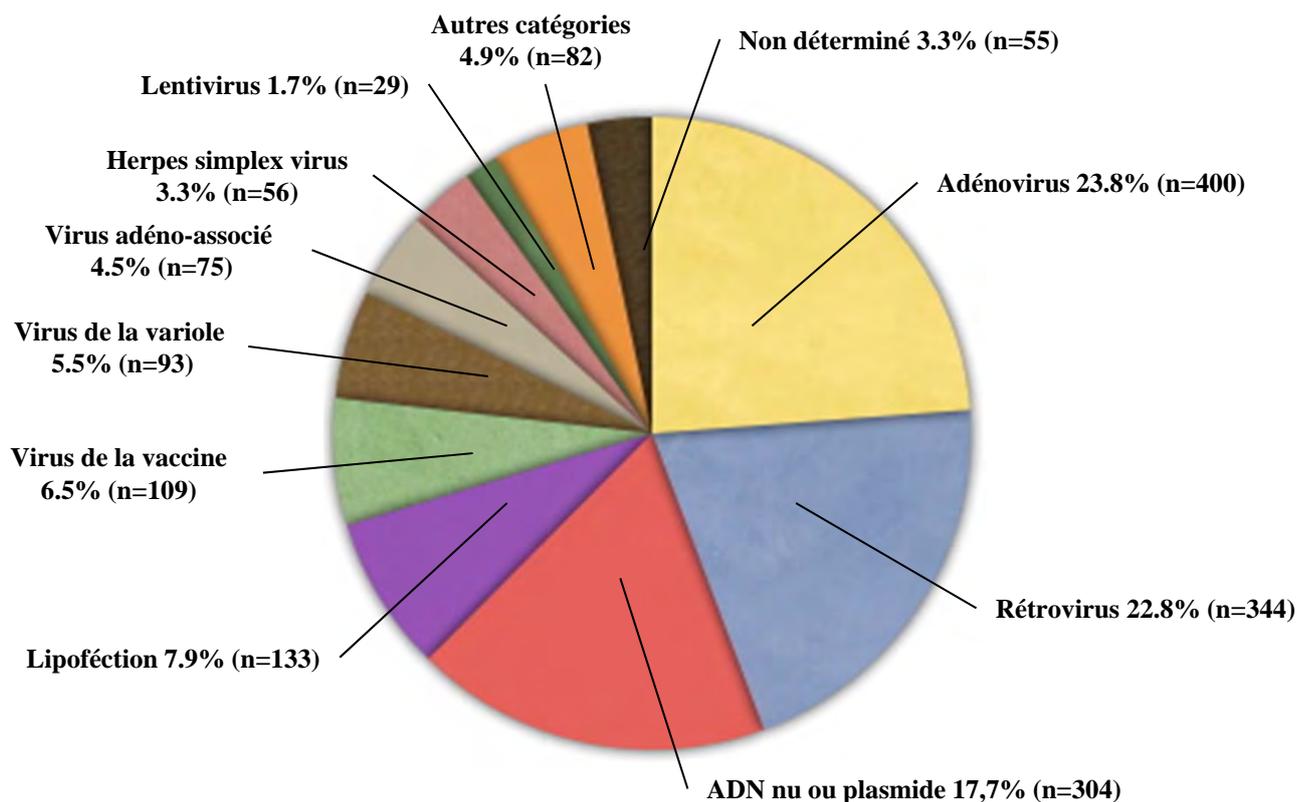
- La prévalence des anticorps anti-AAV est forte dans les populations humaines. Celle-ci oscille entre 10 et 70% de la population selon le sérotype d'AAV et la localisation géographique des populations (Blacklow et al., 1971; Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009; Chirmule et al., 1999). La prévalence de ces anticorps est faible chez les enfants de moins de 8 ans, et négligeable avant 6 mois. Cependant, la prévalence de ces anticorps anti-capside augmente drastiquement avec l'âge, de même que leur activité neutralisante (Chen et al., 2005). Or, la présence préalable d'anticorps neutralisant anti-capside circulant chez un sujet, constitue un frein majeur au transfert de gène expérimental dans de nombreux organes tels que le poumon, le foie et même le cerveau (Halbert et al., 2000; Peden et al., 2009; Scallan et al., 2006).

➤ Dans les organes autres que le SNC et l'œil, l'administration d'un vecteur AAVr induit une forte réponse immune que ce soit chez la souris, le chien ou le primate (Nayak and Herzog, 2010; Zaiss and Muruve, 2008). Si les vecteurs AAVr n'activent pas le complément, leur phagocytose par les cellules dendritiques et macrophagiques induit la sécrétion de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires qui potentialisent la mise en place d'une réponse adaptative (Zhu et al., 2009). Ces réponses immunitaires adaptatives se traduisent par un versant humoral et un versant cellulaire. Le versant humoral se traduit par la production d'anticorps neutralisants contre la capsid de l'AAVr et la production d'anticorps contre le transgène. Ceci a pour conséquences, entre autres, de rendre la ré-administration ultérieure du même vecteur inefficace. Le versant cellulaire se traduit par l'activation et la prolifération des cellules LT CD8+ cytotoxiques spécifiques de la capsid du vecteur, ou du transgène, ce qui aboutit à l'élimination des cellules transduites.

Or, ces réactions immunes sont fortement délétères pour le succès du transfert de gène thérapeutique dans les organes périphériques. Ceci a été illustré récemment par l'échec d'un essai clinique visant à traiter des patients hémophiles déficients pour le facteur de coagulation 9 (FIX). Les patients de cet essai clinique ont été injectés *via* la veine porte hépatique, avec un vecteur AAV2 porteur du transgène FIX (Manno et al., 2006). Manno et coll., puis Mingozzi et coll., ont ainsi montré que l'expression hépatique du FIX ne persiste que quelques jours chez ces patients, et que ceci est corrélé par le développement d'une réponse humorale, et cellulaire cytotoxique LT CD8+ contre la capsid de l'AAV2 (Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2007).

À ce jour, les vecteurs AAVr ont été utilisés dans différents essais cliniques de thérapie génique (**figures 19 et 20**) (Mueller and Flotte, 2008). Ces essais cliniques ont porté sur le traitement des pathologies génétiques neurodégénératives de la rétine ou du SNC (Maguire et al., 2008b; Marks et al., 2008), les pathologies cardiovasculaires (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT00454818 et NCT00534703), ou certaines maladies infectieuses (Vardas et al., 2010). Les principales études de thérapie génique précliniques et cliniques appliquées aux DHR, sont présentées brièvement dans le chapitre 3.

Répartition des essais cliniques en fonction du type de vecteur utilisé (n=1680)



Répartition des essais clinique en fonction de l'application thérapeutique (n=16644)

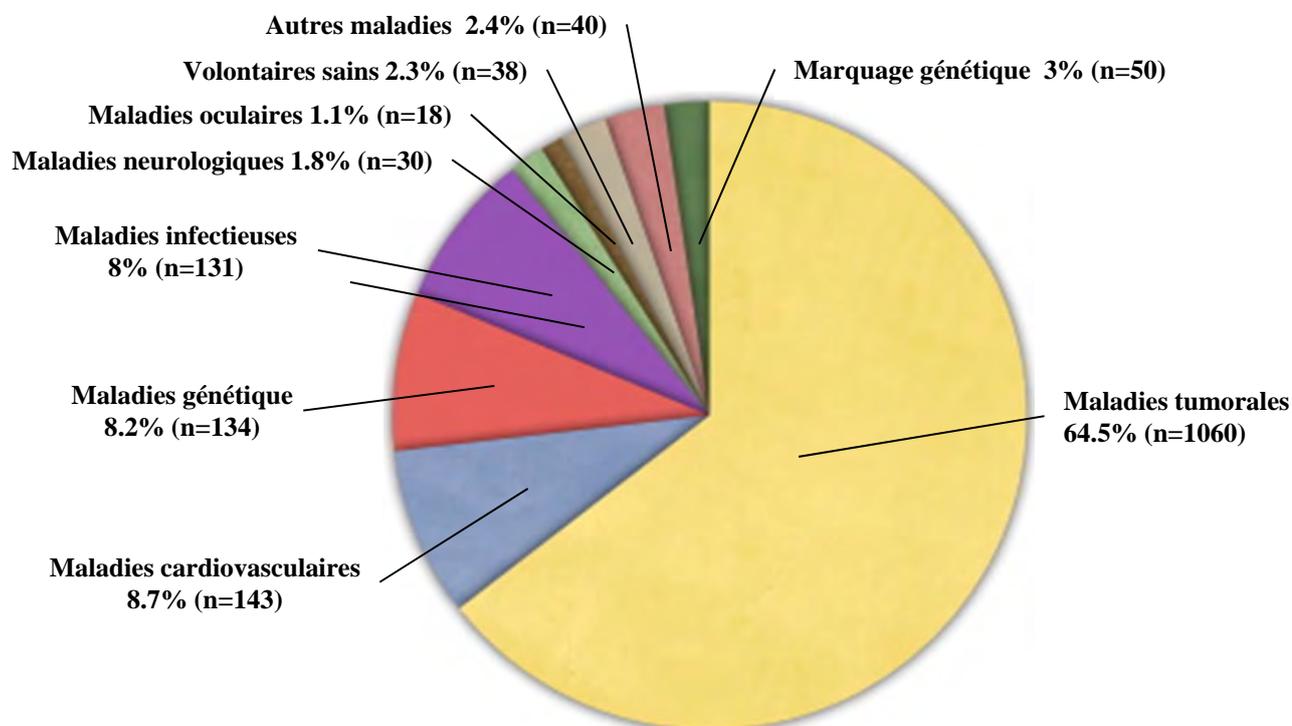


Figure 19. Les essais cliniques de thérapie génique réalisés dans le monde entre 1989 et 2010, en fonction du type de vecteur utilisé et de l'application thérapeutique.

Numéro de l'essai clinique (FDA)	Maladie traitée/transgène thérapeutique	Sérotype/voie d'administration	Phase clinique	Statut	Principal investigateur
0404-638	Déficit α -1-Antitrypsine/AAT	AAV1, intramusculaire	Phase I	Active	TR Flotte
0104-465	Déficit α -1-Antitrypsine/AAT	AAV2, intramusculaire	Phase I	Completed	TR Flotte
0401-623	Alzheimer/Facteur de croissance nerveuse (B-NGF)	AAV2, intracrânienne	Phase I/II	Inactive	DA Bennett
0312-619	Maladie de Batten/CLN2	AAV2, intracrânienne	Phase I	Active	RG Crystal
0307-588	Arthrose/tgAAC94 = anticorps anti-récepteur au facteur nécrosant tumoral (TNFR:Fc)	AAV2, intra-articulaire	Phase I	Completed	Targeted Genetics
0504-705		AAV2, intra-articulaire	Phase I/II	Active	Targeted Genetics
0001-381	Maladie de Canavan/aspartoacylase	AAV2, intracrânienne	Phase I	Active	P Leone
0404-642	Insuffisance cardiaque/SERCA2a	AAV6, intracardiaque	Phase I	N/A	B London
0610-809	Insuffisance cardiaque/SERCA2a	AAV1, intracardiaque	Phase I	N/A	B Greenberg
9409-083	Mucoviscidose/CFTR	AAV2, nasale	Phase I	Completed	TR Flotte
0006-404	Mucoviscidose/CFTR	AAV2, aérosol-poumons	Phase II	Completed	RB Moss
9804-215	Mucoviscidose/CFTR (tgAAVCF)	AAV2, aérosol-poumons	Phase I	Inactive	M Aitken
9507-114	Mucoviscidose/CFTR (tgAAVCF)	AAV2, intra-sinusale	Phase I/II	Inactive	P Gardner
0410-679	Dystrophie musculaire de Duchenne/Mini-dystrophine	AAV5	Phase I	N/A	J Mendell
0407-669	Épilepsie/neuropeptide Y (NPY)	AAV1 et AAV2, Intracrânienne	Phase I	N/A	M During
9901-279	Déficiency en facteur de coagulation IX/mini gène Facteur IX	AAV2, intramusculaire	Phase I	Completed	CS Manno
0001-371		AAV2, intra-artérielle	Phase I	Completed	CS Manno
0410-677	Amaurose congénitale de Leber (dégénérescence rétinienne)/RPE65	AAV2, intraoculaire	Phase I	Active	SG Jacobson
0510-740	Amaurose congénitale de Leber (dégénérescence rétinienne)/RPE65	AAV2, intraoculaire	Phase I	N/A	AM Maguire
9905-317	Dystrophie musculaire de Erb/ γ -sarcoglycane	AAV2	Phase I	N/A	J Mendell
0610-815	Dystrophie musculaire de Erb/ γ -sarcoglycane	AAV1	Phase I	N/A	J Mendell
0104-469	Parkinson/GAD65	AAV2, intracérébrale	Phase I	Completed	M Kaplitt
0307-593	Parkinson/hAADC	AAV2, intracérébrale	Phase I	Active	M Aminoff
0501-689	Parkinson/neurturine sécrétée (Cere-120)	AAV2, intracrânienne	Phase I	Completed	W Marks
0607-788	Parkinson/neurturine sécrétée (Cere-120)	AAV2, intracrânienne	Phase II	Active	NM Boulis
0710-877	Parkinson/GAD65	AAV2, intracérébrale	Phase II	N/A	PL LeWitt

Figure 20. Liste des essais cliniques de thérapie génique réalisé à l'aide des vecteurs recombinants adéno-associés autorisés par la « Food and Drug Administration » et réalisés aux USA jusqu'en 2008.

Illustration issue et adaptée de Mueller and Flotte 2008 Gene Therapy.

2.2.2 Les vecteurs dérivés des virus adénovirus

2.2.2.1 Les virus adénovirus sauvages

Les adénovirus (Ad) sont des virus à ADN double brin, non enveloppés, appartenant à la famille des adenoviridae. Celle-ci compte plus de 100 variants génétiques. Les Ad qui infectent l'homme, appartiennent essentiellement au type « Adénovirus Humain » (HAd). Ils ont généralement un tropisme préférentiel pour les cellules épithéliales présentes dans les muqueuses respiratoires, gastro-intestinales ou oculaires (Sharma et al., 2009). Les Ad sont des virus non intégratifs qui infectent les cellules quiescentes et mitotiques. Les Ad sont des virus pathogènes, l'expression des gènes viraux est cytotoxique et aboutit à la lyse des cellules infectées.

La capsid des HAd est de forme sphéroïde, d'un diamètre d'environ 100 nm, pour un poids moléculaire d'environ 150 MDa (**figure 21**). La capsid des HAd est constituée de 20 facettes triangulaires, aux sommets desquelles est présente une structure filiforme, « la fibre », de longueur et de forme variable. Celle-ci repose à sa base sur la protéine appelée « la base du penton » (El-Bakkouri et al., 2008). La fibre et la base du penton varient en fonction du sérotype de l'HAd, et déterminent en grande partie leur tropisme.

Le génome des HAd avoisine les 36kb (**figure 21**). Il est linéaire dans les virions, mais se circularise dans le noyau des cellules infectées où il persiste sous forme épisomique. Le génome des HAd est constitué d'environ 10 régions codantes qui sont désignées E1 à E4, et L1 à L5. Ces gènes sont exprimés respectivement pendant les phases précoces et tardives du cycle viral (McConnell and Imperiale, 2004). L'ADN viral est encadré aux extrémités 5' et 3' par des séquences répétées inversées dites ITR, et par des séquences « ψ ». Ces séquences ITR et ψ ont pour rôle la compaction de l'ADN dans le virion, sa circularisation, l'expression du génome viral dans sa forme épisomique et l'encapsidation du génome viral.

2.2.2.2 *les vecteurs viraux recombinants des Adénovirus*

Les vecteurs Ad recombinant (rAd) dérivent essentiellement des virus HAd de sérotype 2 et 5 (HAd2 et HAd5), et sont dit soit de première, deuxième ou troisième génération. Les rAd de première génération sont excisés uniquement pour les gènes viraux E1a et E1b afin d'éviter la réplication du vecteur dans les cellules transduites. Les vecteurs adénovirus de seconde sont excisés pour une combinaison de gènes allant d'E1 à E4. Enfin, les vecteurs rAd de troisième génération sont excisés pour tout le génome viral à l'exception des séquences ITR et ψ .

Les vecteurs recombinants HAd (rHAd) présentent de nombreux avantages :

- Les vecteurs rAd de première, deuxième et troisième génération ont une capacité cargo respective d'environ 8 Kb, 14 Kb et 36 Kb. Cette grande capacité cargo constitue un avantage important pour la mise au point de stratégies de thérapie génique d'addition supposant le transport de transgènes de très grande taille. Par exemple, la myopathie de Duchenne Becker est causée par la mutation du gène de la dystrophine, or l'ADNc correspondant, qu'il faudrait apporter dans les cellules musculaires, mesure environ 14kb (Dudley et al., 2004).
- Le génome des rAd persiste dans le noyau des cellules transduites sous forme épisomique, mais permet l'expression à long terme du transgène *in vivo* par exemple dans le foie, en l'absence de réaction immune contre les cellules transduites (Kim et al., 2001; Morral et al., 1999).
- L'efficacité de transduction des rHAd est très grande même pour des MOI inférieures à 10 vg/c, et ceci dans un très grand nombre de types cellulaires et dans de nombreuses espèces animales (Alkhatib and Briedis, 1988; Brunetti-Pierri and Ng, 2008; Yamada et al., 1985).
- Le tropisme des rHAd est large, et permet de transduire efficacement la rétine (Bennett et al., 1996; Bennett et al., 1994; Oshima et al., 2004), le cerveau (Huang et al., 2007), la moelle épinière (Butti et al., 2008), le foie (Brunetti-Pierri et al., 2006; Toietta et al., 2005), et les muscles squelettiques et cardiaques (Dudley et al., 2004; Fleury et al., 2004). Dans la rétine, les vecteurs HAd5 et HAd2 transduisent efficacement les cellules de l'EPR mais faiblement les photorécepteurs après injection sous-rétinienne de ces vecteurs (Anglade and Csaky, 1998; Cashman et al., 2007; Jomary et al., 1994; Li et al., 1994). Cependant, différentes études ont montré que la mutation de la capsid au niveau de la base du penton, permet de produire des vecteurs transduisant plus efficacement les photorécepteurs (Cashman et al., 2007; Sharma et al., 2009; Sweigard et al., 2010).

Cependant, les vecteurs rAd sont associés à une forte immunogénéicité *in vivo*, et en particulier pour les vecteurs de première et deuxième générations :

- L'administration des vecteurs rAd *in vivo* chez l'animal immunocompétent, aboutit à la mise en place de réactions immunitaires et inflammatoires importantes (Nayak and Herzog, 2010). Celles-ci sont d'autant plus importantes, que la prévalence des anticorps neutralisants anti-rAd est forte dans la population générale, et que celle-ci semble être croissante avec l'âge (Mast et al., 2010; Piedra et al., 1998; Thorner et al., 2006).

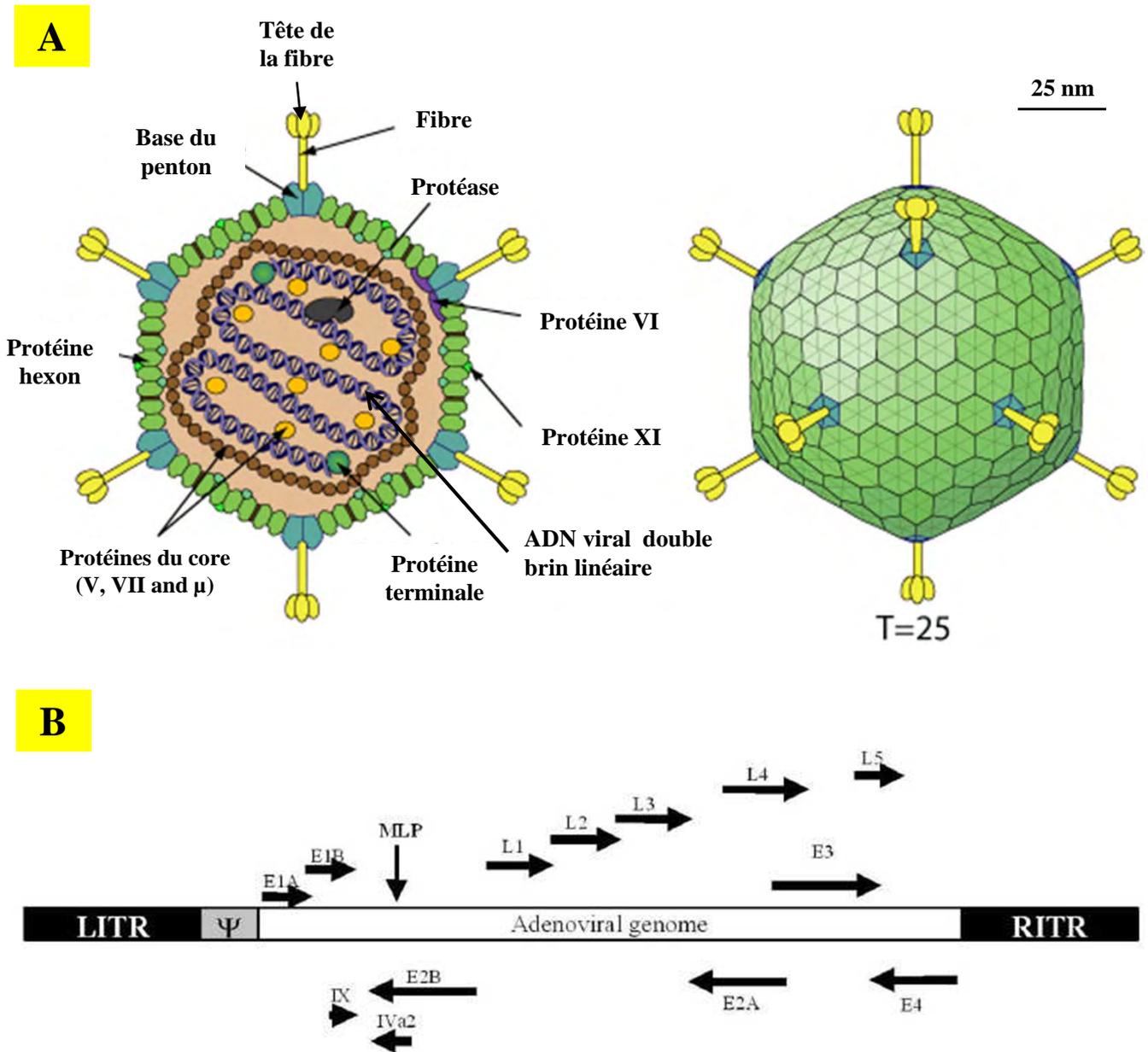


Figure 21. Représentation schématique de la capside et du génome de l'adénovirus sauvage (Ad).

(A) La surface de la capside des Ad est de forme sphéroïde. Sa taille est d'environ 100nm de diamètre. La capside est surmontée de protrusions filiformes appelées « les fibres ». Celles-ci ont une taille et une forme variable selon le sérotype de l'Ad. La fibre repose sur la base du penton et détermine le tropisme des Ad. La capside protège le génome viral qui est associé à différentes protéines virales.

(B) Le génome des Ad est constitué d'une molécule d'ADN linéaire double brin d'environ 36Kb. Le génome des Ad est flanqué aux extrémités 5' et 3', par des séquences terminales répétées (LITR et RITR), qui sont associées de façon covalente avec « la protéine terminale ». En outre, le génome des Ad est flanqué d'une séquence ψ nécessaire à l'encapsidation du génome viral. Le génome de l'Ad est organisé de façon complexe en une dizaine de régions codantes qui sont désignées E1 à E4 et L1 à L5. Ces régions codantes sont exprimées respectivement pendant les phases précoces et tardives du cycle viral, et peuvent produire chacune plusieurs protéines par épissage alternatif.

illustrations issues de <http://www.expasy.ch/viralzone/> (A) et Hakkarainen and Hemminki 2005 *Gene Therapy and Molecular Biology* Vol.9, p153-168 (<http://issuu.com/gtmb/docs/vol9b>) (B).

Les réactions inflammatoires se traduisent par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire, et en particulier de l'Interféron 1 (IFN1), et par l'activation du complément. En effet, Cichon et coll., ainsi que Tian et coll. ont montré que les rAd activent *in vitro* et *in vivo* le complément par les voies classiques et alternes (Cichon et al., 2001; Tian et al., 2009). En outre, l'administration systémique d'un vecteur rAd aboutit à la transduction des cellules présentatrices d'antigènes, et des cellules de Kupffer du foie. Dans ces cellules, la présence des rAd active les récepteurs endosomiques de type TLR2 et TLR9 sensibles à l'ADN double brin viral (Appledorn et al., 2008; McCaffrey et al., 2008; Schiedner et al., 2003). En réponse, ces cellules sécrètent massivement l'IFN1 qui potentialise les réponses naturelles et adaptatives.

Les réponses immunes adaptatives, de types cellulaires et humorales, sont dirigées contre la capsid des rAd et le transgène, mais surtout contre l'expression résiduelle des gènes viraux qui sont très immunogènes pour les vecteurs rAd de première et deuxième génération (Yang et al., 1994) (Nayak and Herzog, 2010; Seiler et al., 2007). Ceci a pour conséquences la destruction des cellules transduites et la perte rapide de l'expression du transgène *in vivo*. Ces réactions immunitaires ont été décrites après la transduction des organes périphériques, mais aussi après l'administration des vecteurs rAd dans le système nerveux central, et dans l'œil (Anand et al., 2002; Campochiaro et al., 2006; Hoffman et al., 1997; Reichel et al., 1998; Thomas et al., 2000). Cependant, les vecteurs rAd de troisième génération, qui ne possèdent pas ces gènes viraux résiduels, permettent de réduire les réponses immunitaires vis-à-vis des cellules transduites et de prolonger l'expression du transgène *in vivo* que ce soit dans l'œil, le cerveau et même le muscle squelettique et le foie (Chen et al., 1997; Kreppel et al., 2002; Morral et al., 1999; Thomas et al., 2001).

Les vecteurs rAd ont été utilisés de très nombreux essais cliniques de thérapie génique (**figure 19**) (Edelstein et al., 2007; Edelstein et al., 2004) (<http://clinicaltrials.gov>). Cependant la toxicité associée à l'utilisation des adénovirus *in vivo* a rapidement constitué un frein majeur à leur utilisation. Ceci a été illustré tragiquement au cours d'un essai clinique portant sur le traitement par thérapie génique, de patients déficients pour l'enzyme ornithine carbamyl transférase (OCT). L'OCT est impliquée dans le métabolisme des protéines. L'administration intraveineuse d'un vecteur rHAD de première génération codant pour l'enzyme OCT à la dose de 6.10^{11} vg (vecteur génome), a ainsi conduit à une forte toxicité systémique et à un syndrome inflammatoire systémique aiguë, qui ont été fatals à un des patients traités (Raper et al., 2003; Raper et al., 2002).

Aujourd'hui, la capacité des rAd à induire une forte réponse immune, et leur durée courte d'expression *in vivo*, sont mises à profit dans certains protocoles de thérapie génique à but vaccinal (Lasaro and Ertl, 2009) ou anti-tumoral (Rein et al., 2006; Swisher et al., 1999) (**figure 19**). Dans l'œil, Chevez et coll. ont montré avec succès le bénéfice thérapeutique d'un vecteur rAd pour traiter cliniquement des patients atteints de tumeurs oculaires de type rétinoblastome (Chevez-Barrios et al., 2005). Dans cette étude, plusieurs enfants souffrant de rétinoblastome ont reçu en intraoculaire un vecteur rAd codant pour un gène de suicide, la thymidine kinase de l'Herpes virus, toxique pour les cellules mitotiques. Ainsi chez plusieurs patients, l'administration du vecteur rAd a permis de réduire très significativement la taille de la masse tumorale, mais pas la soigner complètement.

2.2.3 Les vecteurs dérivés des rétrovirus

2.2.3.1 Les rétrovirus sauvages

Les rétrovirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin appartenant à la famille des *retroviridae*. Celle-ci est constituée de plus 100 virus différents. Ce sous chapitre présentera uniquement les vecteurs dérivés des gammarétrovirus (γ RV) et lentivirus (LTV) qui sont couramment utilisés en thérapie génique (Coffin et al., 1997). Les rétrovirus sont des virus intégratifs et non lytiques. Ils sont à l'origine de nombreuses pathologies, par exemple les LTV comme le HIV induisent des syndromes d'immunodéficience (Weiss, 1996). Les LTV infectent les cellules proliférantes et quiescentes, tandis que les γ RV n'infectent que les cellules proliférantes.

Les virions rétroviraux ont un diamètre d'environ 80 à 100 nm, pour un poids moléculaire d'environ 200 MDa (**figure 22**) (Vogt and Simon, 1999). L'enveloppe lipidique qui entoure la capsid présente un grand nombre de protéines d'origine cellulaires et virales, dont les glycoprotéines virales SU et TM. Ces dernières varient selon l'espèce et le sérotype du virus. Les protéines SU et TM forment un complexe, qui permettent l'adhésion du virion sur les cellules, et qui déterminent largement le tropisme cellulaire des rétrovirus (Nisole and Saib, 2004; Sommerfelt, 1999). La capsid est constituée essentiellement de l'assemblage de 3 protéines : « matrice » (MA), « capsid » (CA) et « nucléocapsid » (NC). Ces trois protéines dérivent de l'hydrolyse d'un précurseur protéique viral codé par le gène « capsid » (CA) (Coffin et al., 1997). La capsid protège le génome viral qui est associé à de nombreuses protéines virales.

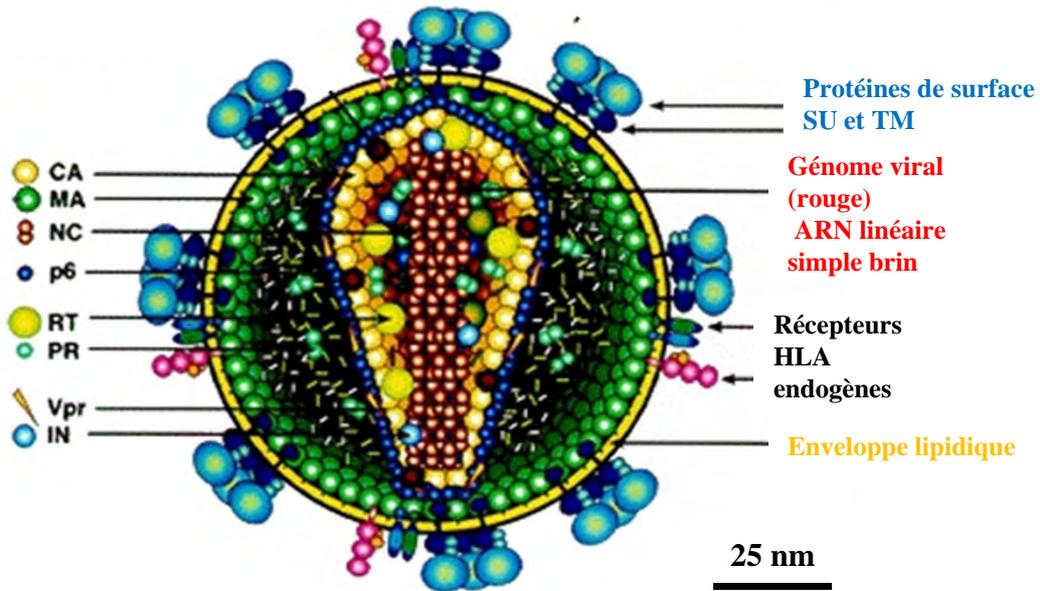
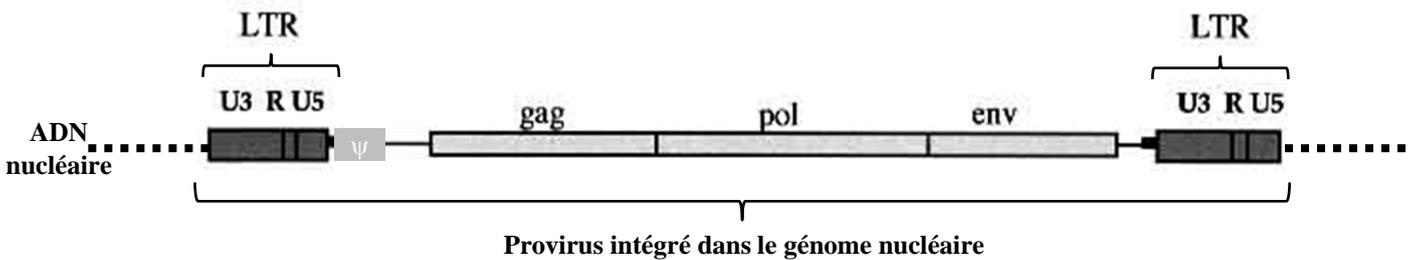
A**B**

Figure 22. Représentation schématique de la capsid et du génome des rétrovirus sauvage.

(A) Les rétrovirus sont entourés d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des protéines cellulaires (HLA) et virales (SU et TU). Ces dernières conditionnent l'adhésion et l'entrée cellulaire. La face interne de l'enveloppe est couverte par les protéines virales « matrice » (MA). La capsid est formée essentiellement de la protéine « capsid » (CA). La capsid protège le génome viral qui est sous la forme de 2 molécules d'ARN simple brin. L'ARN viral est associé aux protéines virales : Nucléocapside (NC), Reverse Transcriptase (RT), Protéase virale (PRO), et Intégrase (IN).

(B) Le génome des LTV est schématisé ici sous forme intégrée dans le génome de la cellule hôte. Celui-ci est organisé en 3 régions codantes principales **GAG**, **POL**, et **ENV**. De plus, il existe de nombreux gènes accessoires qui ne sont pas représentés ici. La taille du génome des rétrovirus est d'environ 10 Kpb. Le gène **GAG** code pour les protéines de la capsid (CA, MA, NC). Le gène **POL** code pour IN et RT. Le gène **ENV** code pour SU et TU. En outre, le génome des rétrovirus est flanqué aux extrémités 5' et 3' par des séquences d'environ 500 pb, ce sont les « long terminal repeat » (LTR). Les LTR sont nécessaires à la retro-transcription, l'intégration, la régulation de l'expression virale, la réplication du génome. Les LTR sont constitué d'une région répétée (R) et de deux régions uniques (U3 et U5). Finalement, la séquence ψ , flanquante en 5', permet l'encapsidation du génome viral.

Illustrations issues de Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

Le génome des rétrovirus est constitué de 2 molécules identiques d'ARN linéaire, de polarité positive, et dont la taille est d'environ 10 Kb. L'ARN viral est associé dans la capsid aux protéines « nucléocapside » (NC), « reverse transcriptase » (RT), « intégrase » (IN) et « protéase » (PRO). Dans la cellule hôte, l'ARN viral est converti en ADN double brin par la RT, puis il est intégré de façon plus ou moins aléatoire dans le génome de la cellule hôte par l'IN. En outre, le génome viral peut être présent dans le noyau soit sous forme intégrée, soit sous la forme d'épisome circulaire (Pierson et al., 2002). Le génome viral est organisé en 4 régions codantes principales (**figure 22**). Les régions *GAG* et *ENV* codent pour les protéines de la capsid et de l'enveloppe, tandis que la région *POL* code pour les enzymes IN et RT. Enfin, la région *PRO* code pour l'enzyme PRO nécessaire à la maturation des protéines de la capsid. Le génome viral est flanqué aux extrémités 5' et 3', par des séquences courtes répétées d'environ 500 pb. Ce sont les séquences « Long Terminal Repeat » (LTR) qui portent le promoteur viral et les séquences nécessaires à l'intégration dans le génome de la cellule hôte. De plus, le génome virale est flanqué en 5' par la séquence « ψ » nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral.

2.2.3.2 Les vecteurs viraux recombinants *gammarétrovirus* et des *lentivirus*

Les vecteurs LTV et γ RV modernes ne conservent du génome viral que les séquences LTR et les séquences d'encapsidation.

Les vecteurs LTV et γ RV présentent plusieurs avantages pour la thérapie génique :

- La capacité cargo des vecteurs LTV et γ RV est relativement importante, avec une taille d'encapsidation maximum d'environ 10 Kb. Kumar et coll. ont montré que celle-ci peut être poussé à 18 Kb expérimentalement en augmentant la taille de la cassette d'expression entre les 2 LTR. Cependant, ceci se fait au détriment de la concentration final du vecteur produit, qui est alors divisée par un facteur 1000 (Kumar et al., 2001).
- Ces vecteurs permettent de transduire un vaste panel de types cellulaires dans différentes espèces. Ils ont été évalués, entre autres, dans les cellules d'origines hématopoïétiques (Joyner et al., 1983; Priller et al., 2001), les cellules neurales (Naldini et al., 1996), les hépatocytes (Kafri et al., 1997), la rétine (Miyoshi et al., 1997; Price et al., 1987), ou encore les cellules embryonnaires pour la genèse d'animaux transgéniques (Lois et al., 2002).

Dans l'œil adulte, les vecteurs LTV dérivés du virus HIV, transduisent efficacement les cellules de l'EPR et les photorécepteurs après administration sous-rétinienne de ce vecteur chez la souris. Ce vecteur permet une expression à long terme du transgène dans la rétine, sans induire d'effets délétères pour la rétine (Bainbridge et al., 2001; Duisit et al., 2002; Miyoshi et al., 1997; Yanez-

Munoz et al., 2006). Les LTV permettent aussi la transduction de l'épithélium cornéen lorsque ceux-ci sont injectés dans la chambre antérieure de l'œil (Bainbridge et al., 2001). Dans l'œil du rat nouveau-né, les vecteurs HIV permettent une transduction efficace et durable des photorécepteurs et des cellules de l'EPR, dans une grande partie de la rétine après administration sous-rétinienne (Miyoshi et al., 1997).

- Ces vecteurs sont à l'origine du développement de réactions immunitaires naturelles et adaptatives, mais ils sont faiblement immunogènes (Follenzi et al., 2007). Dans l'œil, ils génèrent une réaction inflammatoire locale modérée et transitoire (Ikeda et al., 2009), sans induire de lésions tissulaires ou fonctionnelles. Ces réactions immunitaires semblent essentiellement dirigées contre les cellules transduites exprimant le transgène, ce qui induit leur élimination, que ce soit chez la souris ou le primate, après la transduction d'organes périphériques tels que le foie ou les cellules sanguines (Follenzi et al., 2004; Morris et al., 2004; Nayak and Herzog, 2010).

Cependant, les vecteurs rétroviraux présentent 2 inconvénients majeurs :

- Les méthodes de production actuelles ne permettent pas d'obtenir des concentrations de vecteurs supérieures à 10^7 - 10^{10} particules infectieuses par mL (Rodrigues et al., 2007). Ceci exclu leur usage pour tout protocole d'administration *in vivo* nécessitant des doses importantes de vecteur, afin de transduire des organes de grande taille tel que les muscles squelettiques.
- Le caractère intégratif de ces vecteurs est associé à un fort risque de mutagénèse insertionnelle et de tumorigenèse. Ceci est particulièrement vrai lorsque l'insertion du vecteur a lieu dans le génome de la cellule hôte, au niveau d'un gène régulant le cycle cellulaire ou l'apoptose (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Persons, 2010; Schroder et al., 2002). Cela a conduit au développement des vecteurs self-inactivated (SIN) et non-intégratifs qui sont respectivement mutés dans le LTR pour inhiber l'activité transcriptionnelle virale (Zufferey et al., 1998), et pour l'intégrase virale qui est encapsidée dans le vecteur recombinant, afin de bloquer l'intégration dans le génome cellulaire (Banasik and McCray, 2010).

Les vecteurs rétroviraux sont largement utilisés dans les protocoles cliniques de thérapie génique d'addition *ex vivo* (**figure 19**) (Edelstein et al., 2007). Les vecteurs LTV et γ RV ont été particulièrement utilisés pour le traitement des déficits immunitaires congénitaux (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Gaspar et al., 2004; Qasim et al., 2009), et pour les pathologies métaboliques (Biffi and Naldini, 2005; Cartier et al., 2009).

2.2.4 Les vecteurs dérivés des herpès simplex virus

2.2.4.1 Les herpes virus sauvages

Les herpes virus sont des virus à ADN double brin enveloppés (Davison, 2010). Dans ce sous chapitre, seuls sont présentés les vecteurs recombinants dérivant du virus humain herpès simplex 1 (HSV1). HSV1 est un virus lytique, non intégratif, à infection cellulaire latente. De plus, c'est un virus pathogène, affectant principalement les cellules épithéliales, les muqueuses et les neurones (Whitley and Roizman, 2001).

Le virion HSV1 est entouré d'une bicouche lipidique d'environ 200 nm (**figure 23**), dans laquelle sont ancrées de nombreuses glycoprotéines virales qui sont nécessaires à l'attachement du virus à la cellule et à l'internalisation cellulaire (Taylor et al., 2002).

De ce fait, ces protéines membranaires de surfaces (gB, gC, gD, gH et gL) déterminent le tropisme des différents sérotypes de HSV1 (Akhtar and Shukla, 2009). La capside est de forme icosaédrique, et a un diamètre de 120 nm. Elle est entourée par une matrice protéique sous-jacente à l'enveloppe qui est appelée « le tégument » (Grunewald et al., 2003; Taylor et al., 2002; Zhou et al., 2000). La capside abrite le génome viral qui se compose d'une molécule d'ADN linéaire fortement condensée.

Le génome de HSV1 est linéaire et a une taille d'environ 150 Kb (**figure 23**). Celui-ci porte plus de 84 unités transcriptionnelles, organisées de façon complexe autour de deux régions codantes. Ce sont « la région unique courte » (U_S) et « la région unique longue » (U_L) (**figure 23**) (Lehman and Boehmer, 1999). U_S et U_L sont encadrées par des séquences répétées, avec les séquences DR aux extrémités 5' et 3' de la molécule d'ADN. Ces séquences DR sont nécessaires, entre autres, à l'encapsidation du génome (Taylor et al., 2002). En outre, la présence de plusieurs origines de réplication, dites HSV Ori, permettent la réplication du génome viral de façon synchrone avec celle du génome cellulaire.

2.2.4.2 les vecteurs viraux recombinants dérivés de l'herpès simplex virus 1

On distingue trois catégories de vecteurs dérivés de HSV1 (rHSV1), qui se distinguent par la proportion résiduelle plus ou moins grande de génome viral sauvage, dans les vecteurs rHSV1 (Epstein, 2005b; Watanabe, 2010) :

- **Les vecteurs rHSV1 compétents pour la réplication** (rHSV RC) sont excisés pour environ la moitié du génome viral, mais conservent les gènes essentiels à la réplication (Argnani et al., 2005). Ces vecteurs rHSV RC sont capables de se propager *in vivo* et donc de transduire un grand nombre de cellules après injection *in vivo*.

Cependant, ces vecteurs induisent de nombreuses réactions cytopathiques et immunogènes *in vivo*. L'immunotoxicité de ces vecteurs est expliquée entre autres par la très forte prévalence des anticorps anti-HSV1 chez l'homme (Smith and Robinson, 2002). L'effet cytopathique de ces vecteurs est associée à l'expression des gènes viraux résiduels, dont l'expression peut induire l'apoptose des cellules transduites (Johnson et al., 1992). En outre, ces rHSV RC induisent une forte réponse immune naturelle et adaptative contre l'enveloppe et la capside. En effet, les rHSV RC induisent l'activation du complément, des récepteurs TLR et des cellules macrophagiques (Ryan and Federoff, 2009). En outre, leur capacité de propagation pourrait laisser craindre la dissémination du transgène vers d'autres individus, ou vers le fœtus chez la femme enceinte.

- **Les vecteurs rHSV défectifs pour la réplication (rHSV RD)** sont excisés pour les gènes nécessaires à la réplication, afin d'atténuer leur virulence et leur cytotoxicité (Berto et al., 2005; Johnson et al., 1992). Cependant, ils restent très immunogènes (Ryan and Federoff, 2009).
- **Les vecteurs rHSV1 amplicon** encapsident une molécule d'ADN dérivant d'un plasmide bactérien (Epstein, 2005a), qui ne conserve du génome HSV1 que les séquences « HSV Ori » et « pac » nécessaires à la production du vecteur recombinant. Ces vecteurs rHSV1 amplicon présentent l'avantage d'être moins cytotoxique et moins immunogènes que les vecteurs rHSV1 RC et rHSV1 RD (Ryan and Federoff, 2009).

Les vecteurs rHSV présentent, un certain nombre d'avantages pour la thérapie génique :

- Les rHSV1 disposent d'une très grande capacité cargo pouvant s'élever jusqu'à environ 150 Kb pour les vecteurs rHSV1 amplicon (Watanabe, 2010).
- Les rHSV1 sont capables d'une bonne efficacité de transduction dans un vaste panel de types cellulaires quiescentes et mitotiques (Heldwein and Krummenacher, 2008). En outre, les vecteur rHSV peuvent transduire les neurones du système nerveux central de façon antérograde et rétrograde, car ils sont transportés dans les axones et les dendrites par le cytosquelette de façon antérograde et rétrograde (Berges et al., 2007; Boldogkoi et al., 2004).

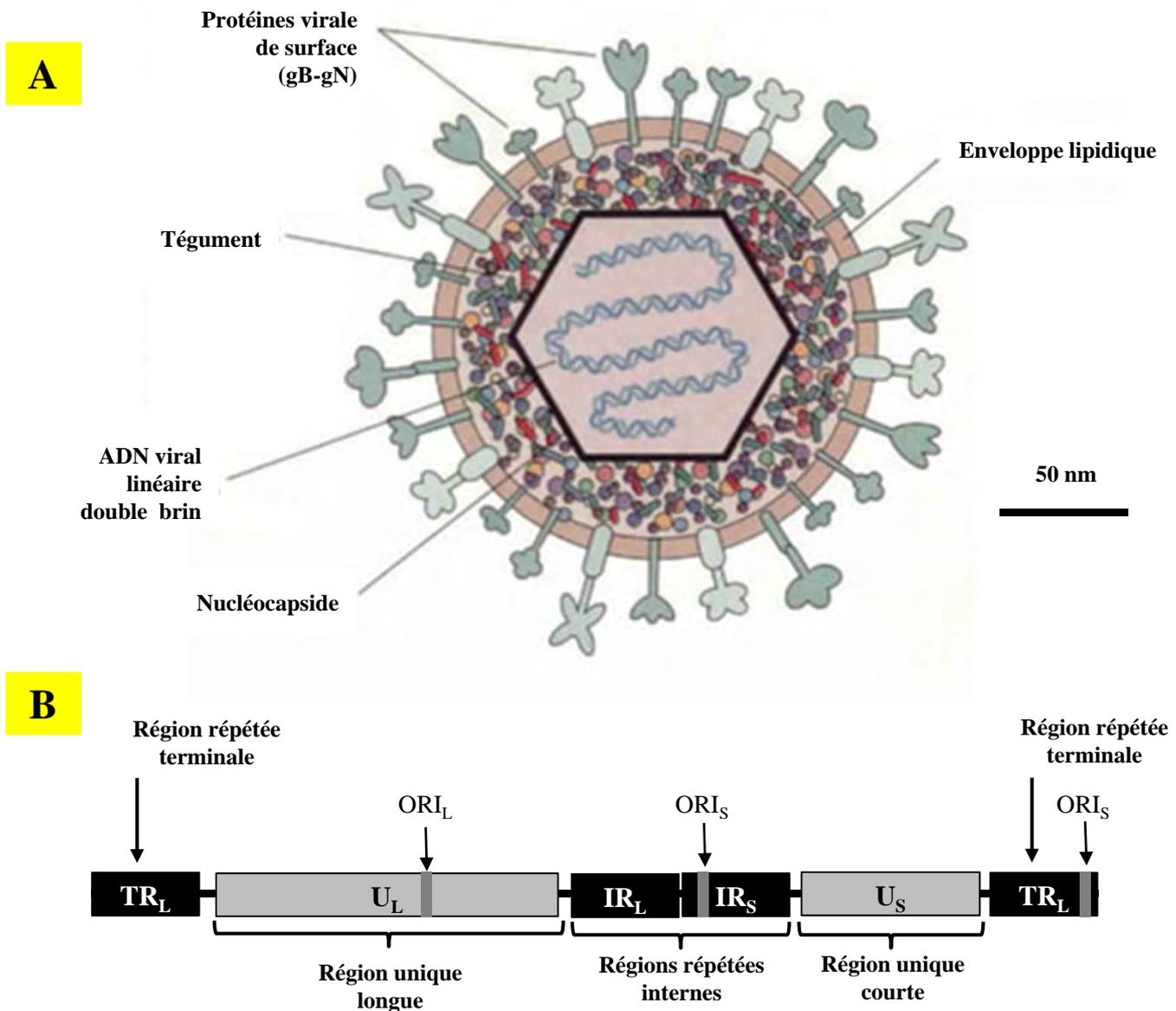


Figure 23. Représentation schématique de la capside et du génome de l'herpes simplex virus.

(A) L'herpes simplex virus (HSV) est entouré d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées des protéines virales dénommées gB à gN. Celles-ci sont essentielles à l'adhésion et à l'internalisation cellulaire, ce qui conditionne son tropisme. La taille du virion est d'environ 200 nm. Le tégument est une matrice protéique sous-jacente à l'enveloppe, qui entoure la capside. Le tégument est constitué de protéines structurales et régulatrices. En outre, le tégument solidarise la capside à l'enveloppe. La capside est de forme icosaédrique et protège le génome viral qui est associé à de nombreuses protéines virales.

(B) Le génome des HSV est linéaire et double brin. Sa taille est d'environ 150 Kpb. Celui-ci est organisé de façon complexe en 2 régions codantes uniques et polycistroniques, la région unique longue U_L et la région unique courte U_C. Celles-ci sont flanquées de régions répétées internes (IR_L et IR_S) et externes (TR_L et TR_S). Ces séquences répétées portent entre autres le signal d'encapsidation, et des origines de répliation. Les régions U_L et U_C codent ensemble pour environ 84 protéines dont seulement la moitié est essentielle à l'accomplissement du cycle viral de HSV.

Illustrations adaptées de Taylor 2002 Frontier Biosciences .

Ces avantages sont cependant largement contrebalancés par l'immunogénéicité importante et le caractère cytopathique de ces vecteurs rHSV. Dans l'œil, les vecteurs rHSV-1 RD et amplicon ont été évalués chez le primate (Liu et al., 1999) et le rat (Fraefel et al., 2005; Spencer et al., 2000). L'injection intra-vitréenne des vecteurs rHSV aboutit à la transduction très partielle des cellules l'EPR et des cellules ganglionnaires, ainsi que du réseau trabéculaire et des corps ciliaires (Liu et al., 1999). L'injection sous-rétinienne de ces vecteurs aboutit à la transduction exclusive de l'EPR (Fraefel et al., 2005). Cependant, dans toutes ces études, l'expression du transgène a été décrite comme de très courte durée (moins de 10 jours). Celle-ci est associée à la mise en place d'une réaction inflammatoire.

Les vecteurs rHSV-1 sont peu utilisés expérimentalement et cliniquement en thérapie génique (**figure 19**). Ces vecteurs rHSV1 sont principalement utilisés dans la mise au point de protocoles de vaccination, et de stratégie anti-tumorales, où leur forte immunogénéicité est mise à profit pour amplifier l'effet biologique du transgène *in vivo* (Santos et al., 2006; Shen and Nemunaitis, 2006).

2.3 Les vecteurs AAV recombinant comme vecteur de choix pour le transfert de gène dans la rétine

Les vecteurs rAAV peuvent être considérés pour plusieurs raisons comme les vecteurs de choix pour le développement de stratégies de thérapie génique d'addition *in vivo* dans la rétine. Les vecteurs AAVr présentent les avantages d'avoir un tropisme particulièrement bien adapté au transfert de gène dans la rétine, et que cela ne soit pas délétère pour la rétine.

2.3.1 Le tropisme oculaire

Afin d'optimiser le transfert de gène thérapeutique, le choix du vecteur se fait sur sa capacité à transduire efficacement les cellules d'intérêt, et à limiter au maximum la dissémination du vecteur et du transgène dans les autres types cellulaires.

Parmi la douzaine de sérotypes d'AAVr clonés et caractérisés à ce jour, le tropisme et la force d'expression dans la rétine de nombreux sérotypes ont été évalués après injection sous-rétinienne et intra-vitréenne (**figures 24 et 25**).

Ainsi, le tropisme dans la rétine a été déterminé pour les vecteurs d'origines humaines et simiennes de sérotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 (**figure 24 et 25**) (Allocca et al., 2007; Giove et al., 2010; Hellström et al., 2008; Surace and Auricchio, 2008). En outre, les vecteurs, AAVhu29R, AAV2/rh.64R1, AAVrh43, AAV2/po1 respectivement d'origine humaine, simienne et porcine ont aussi été évalué dans la rétine (Allocca et al., 2007; Bello et al., 2009). Ces études ont mis en évidence que le tropisme des vecteurs AAVr est conditionné essentiellement par la voie d'injection

du vecteur AAVr et par le sérotype de l'AAVr utilisé. Ainsi, il est possible de cibler plus ou moins spécifiquement, un ou plusieurs types cellulaires de la rétine :

- Le transfert de gène dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs est de loin celui qui a été le plus étudié, étant donnée l'intérêt thérapeutique majeur du transfert de gène dans ces cellules pour le traitement des DHR :

La transduction efficace des cellules de l'EPR est permise chez l'adulte, par l'administration sous-rétinienne des vecteurs AAV de sérotype 1, 2, 4, 5, 8 et 9 et AAV2/po1 (Ali et al., 1996; Allocca et al., 2007; Auricchio et al., 2001; Bello et al., 2009; Lotery et al., 2003; Stieger et al., 2008; Weber et al., 2003). Les vecteurs AAV5, AAV2/po1, AAV8 et AAV9 permettent d'induire l'expression du transgène dans les cellules de l'EPR, de la façon la plus forte et la plus rapide. Cependant ces mêmes vecteurs transduisent aussi les photorécepteurs après injection sous-rétinienne pour les vecteurs AAV5, AAV2/po1 AAV8 et AAV9, en plus des cellules de Müller pour les vecteurs AAV2/po1, AAV8 et AAV9. À ce jour, seuls les vecteurs AAV 1 et 4 permettent une transduction efficace et exclusive des cellules de l'EPR (Auricchio et al., 2001; Weber et al., 2003). Cependant, l'injection sous-rétinienne de ces vecteurs ne permet pas de transduire la rétine au-delà la zone couverte par la bulle sous-rétinienne d'injection, et ceci indépendamment du sérotype utilisés.

La transduction efficace des photorécepteurs est permise uniquement par l'administration sous-rétinienne des vecteurs AAV2, 5, 8 et 9, et AAV2/po1 (Ali et al., 1996; Allocca et al., 2007; Bello et al., 2009; Lei et al., 2009; Lotery et al., 2003; Stieger et al., 2008). La transduction des photorécepteurs est obtenue avec une efficacité croissante en utilisant les sérotypes AAV2, AAV5, AAV2/po1 et AAV8/AAV9. En outre, les vecteurs rAAV8 et 9 permettent d'induire l'expression du transgène dans le photorécepteur de la façon la plus rapide. Les vecteurs AAV8 et AAV9 permettent aussi la transduction de la rétine légèrement au-delà de la bulle d'injection, contrairement aux autres sérotypes (Allocca et al., 2007; Lei et al., 2009; Stieger et al., 2008). Il n'existe pas à ce jour de vecteur rAAV transduisant exclusivement les photorécepteurs.

- Les cellules de Müller sont transduites de façon efficace, mais non exclusive, par les vecteurs AAV 6, 8 et 9 et le vecteur AAV2/po1, après leur injection sous-rétinienne (Allocca et al., 2007; Bello et al., 2009; Hellström et al., 2008; Lei et al., 2009). En outre, l'administration intravitréenne du vecteur AAV6 permet de transduire les cellules de Müller, en plus des cellules ganglionnaires chez la souris (Aartsen et al., 2010).

Sérotype	Souris	Rat	Chien	Primate
AAV1	EPR	EPR	ND	ND
AAV2	EPR, PR	EPR, PR	EPR, PR	EPR, PR
AAV3	Aucune cellule	ND	ND	ND
AAV4	ND	EPR	EPR	EPR
AAV5	EPR, PR	EPR, PR	EPR, PR	EPR, PR
AAV6	EPR	EPR	ND	ND
AAV7	EPR, PR, CM	ND	ND	ND
AAV8	EPR, PR, CM	EPR, PR, CG	EPR, PR, CG	ND
AAV9	EPR, PR, CM	EPR, PR	ND	ND
AAV10	ND	ND	ND	ND

Abréviations : EPR, épithélium pigmentaire rétinien. PR, photorécepteurs. CB, cellules bipolaires. CH, cellules horizontales. CA, cellules amacrines. CG, cellules ganglionnaires. CM, cellules de Müller. ND, non déterminé.

Figure 24. Tropisme des principaux vecteurs AAVr dans la rétine après administration sous-rétinienne dans différents modèles animaux.

Sérotype	Souris	Rat	Chien	Primate
AAV1	Aucune cellule	Aucune cellule	ND	ND
AAV2	CG (fort)	CG (fort)	CG (fort)	CG (fort)
AAV3	Aucune	ND	ND	ND
AAV4	Aucune cellule	ND	ND	ND
AAV5	Aucune cellule	Aucune cellule	ND	ND
AAV6	CM, CB, CA (faible)	ND	ND	ND
AAV7	Aucune cellule	ND	ND	ND
AAV8	CG (faible)	Aucune cellule	ND	ND
AAV9	ND	Aucune cellule	ND	ND
AAV10	CG, CH, CA (fort)	ND	ND	ND

Abréviations : EPR, épithélium pigmentaire rétinien. PR, photorécepteurs. CB, cellules bipolaires. CH, cellules horizontales. CA, cellules amacrines. CG, cellules ganglionnaires. CM, cellules de Müller.

Figure 25. Tropicité des principaux vecteurs AAVr dans la rétine après administration intra-vitréenne dans différents modèles animaux.

- De même, les cellules horizontales et amacrines ne disposent pas de sérotypes, permettant de les cibler préférentiellement. Cependant l'injection intra-vitréenne du vecteur AAV10 permet de transduire efficacement ces cellules, en plus des cellules ganglionnaires chez la souris (Giove et al., 2010).
- La transduction des cellules bipolaires n'a été décrite qu'après administration intra-vitréenne du vecteur AAV6 chez la souris (Hellström et al., 2008).
- Les cellules ganglionnaires sont transduites efficacement par administration intra-vitréenne du vecteur AAV2, tandis que les sérotypes rAAV6, 8, 9 et 10 ne les transduisent que faiblement (Hellström et al., 2008; Petrs-Silva et al., 2009). Il est intéressant de noter que les cellules ganglionnaires peuvent aussi être transduites modérément par le vecteur rAAV8 après injection sous-rétinienne (Stieger et al., 2008).
- En outre, le segment antérieur de l'œil (cornée, iris et corps ciliaires) est transduit après injection dans la chambre antérieure de l'œil, des vecteurs AAVr de sérotype 2, 5, 6, 8 ou 9 (Sharma et al., 2010; Smith et al., 2005).

2.3.2 L'innocuité des vecteurs AAVr dans la rétine

L'innocuité du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs rAAV a été montrée au cours de nombreuses études chez la souris, le rat, le chien, et le primate (Flannery et al., 1997; Bennett, 1999 #1737; Stieger et al., 2007). Ainsi, le groupe du Dr. Bennett a mis en évidence que l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAVr, induit uniquement une réaction inflammatoire faible, locale et transitoire, ainsi que la mise en place d'une réaction immune déviée vis-à-vis du transgène, induisant sa tolérisation (Amado et al., 2010; Bennett, 2003). En outre les 3 premiers essais cliniques de thérapie génique pour le traitement de la RP associée à la mutation du gène RPE65, ont mis en évidence l'absence à court et à long terme de toxicité oculaire ou systémique associée à l'administration sous-rétinienne d'un vecteur recombinant AAV2 (Bennicelli et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b). De plus, ces études ont montré chez tous les patients traités, l'absence de réponses immunitaires adaptatives, humorales ou cellulaires, dirigées contre le transgène thérapeutique. Cependant, certains des sujets traités ont montré une élévation de la concentration sérique de leur anticorps neutralisant anti-AAV2, bien que cela n'ait pas induit de d'effets mesurables dans l'œil ou sur le transfert du gène thérapeutique à long terme dans la rétine.

Si les vecteur AAVr sont des outils thérapeutiques prometteurs pour le traitement des DHR, il semble pertinent d'optimiser l'efficacité du transfert de gène dans la rétine de ces protocoles afin d'augmenter leur potentiel thérapeutique. Les principales stratégies d'optimisation du transfert de

gène dans la rétine à l'aide de ces vecteurs AAVr, sont brièvement décrites dans le sous chapitre suivante.

2.4 L'optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs dérivés AAVr

La littérature scientifique fait état de très nombreuses stratégies visant à optimiser le transfert de gène, que ce soit dans la rétine ou dans d'autres organes. On peut grossièrement les diviser en 2 catégories. **(1)** L'amélioration du vecteur AAVr en lui-même, pour faciliter l'entrée dans la cellule, le transport vers le noyau et la conversion double brin du génome recombinant. **(2)** L'amélioration de la cassette d'expression pour optimiser la spécificité d'expression du transgène, ainsi que son niveau d'expression.

2.4.1 L'optimisation des vecteurs AAVr

2.4.1.1 Les vecteurs scAAV double brin

Les vecteurs rAAV double brin (scAAV) ont été développés récemment afin de pouvoir s'affranchir de l'étape de conversion du génome viral simple brin en ADN double brin, qui a lieu dans les cellules transduites. Ces vecteurs scAAV sont constitués d'une molécule d'ADN simple brin qui se divise en deux parties, qui sont complémentaires l'une de l'autre par appariement de bases. Ainsi l'hybridation du génome scAAV sur lui-même, permet de produire une molécule double brin sans passer par la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire comme pour les vecteurs AAVr simple brin (ssAAV). Ces vecteurs scAAV ne sont ainsi pas limités par le rendement faible de la conversion double brin du génome recombinant, au cours de la transduction cellulaire (Fisher et al., 1996; McCarty, 2008).

In vivo, les vecteurs scAAV induisent l'expression du transgène de façon plus rapide et plus forte que leur homologue ssAAV, que ce soit dans le foie, le cerveau, ou le muscle (Fu et al., 2003; McCarty et al., 2003; Nathwani et al., 2006; Wang et al., 2003). Dans la rétine, ces vecteurs scAAV ont montré aussi montré une meilleure efficacité de transduction que les vecteurs ssAAV chez la souris et le chien, en particulier pour la transduction des cellules de l'EPR et les photorécepteurs (Koilkonda et al., 2009; Natkunarajah et al., 2007; Petersen-Jones et al., 2009; Yokoi et al., 2007). Cependant, la capacité cargo des vecteurs scAAV étant identique à celle des vecteurs ssAAV, la taille maximale de la cassette d'expression que l'on peut y intégrer, se trouve de fait divisée par 2.

2.4.1.2 Les modifications de la capsidie des vecteurs AAVr

La connaissance croissante de la biologie des virus sauvage AAV a permis le développement expérimental de nouveaux sérotypes de vecteurs AAVr recombinant plus performant (Choi et al., 2005; Mitchell et al., 2010). Ces stratégies visent à modifier la structure primaire et tertiaire des protéines de la capsidie. Ces modifications peuvent être réalisées dans le but d'augmenter l'efficacité de transduction, de modifier le tropisme soit en le restreignant soit en l'élargissant. Ces modifications peuvent être réalisées selon 2 approches méthodologiques différentes : la mutagénèse rationnelle et la mutagénèse aléatoire.

- La mutagénèse rationnelle consiste à modifier de façon déterminée des domaines protéiques de la capsidie afin d'augmenter, de diminuer, ou de changer les propriétés biologiques de ces domaines :
 - Afin de diminuer le tropisme hépatique de l'AAV2, Asokan et coll. ont évalué *in vivo* le remplacement des domaines en boucle de la capsidie du vecteur rAAV2 par ceux du vecteur rAAV8 (Asokan et al., 2010). En effet, ces domaines en boucle confèrent au vecteur AAV2 une grande partie de son tropisme (Kern et al., 2003; Opie et al., 2003). Ainsi, Asokan et coll. ont montré une modification du tropisme de ces vecteurs modifiés, dit AAV2i8, après injection intraveineuse chez la souris. Alors que le vecteur AAV2 transduit préférentiellement le foie, le vecteur AAV2i8 favorise la transduction des muscles squelettiques et cardiaques au détriment du tropisme hépatique caractéristique de l'AAV2.
 - Afin d'améliorer le tropisme musculaire de l'AAV2, Yu et coll. ont évalué l'insertion dans les domaines en boucle de la capsidie de l'AAV2, d'un court peptide à forte affinité pour les cellules musculaires (Yu et al., 2009). Ce peptide « MTP » a été généré au cours d'une étude préalable, par phage display, et validé *in vitro* et *in vivo* (Samoylova and Smith, 1999). Ainsi, Yu et coll. ont montré que le vecteur modifié, AAV2₅₈₇MTP, dispose d'une efficacité de transduction pour les muscles squelettiques supérieure à celle de l'AAV2 non modifié, après injection intramusculaire chez la souris.
 - Afin d'augmenter l'efficacité de transduction des vecteur AAVr et de diminuer la dégradation cellulaire des AAVr, plusieurs études ont évalué l'impact de la substitution de certains résidus tyrosines de la capsidie (Markusic et al., 2010; Petrs-Silva et al., 2008). En effet, différentes études ont montrées que certains résidus tyrosines présents à la surface la capsidie jouent un rôle majeur dans la dégradation intracellulaire des particules virales recombinantes et sauvages, après leur entrée dans la cellule. En effet, la

phosphorylation de ces résidus tyrosine par l'enzyme EGFR est corrélée à l'ubiquitination des virions, et à leur dégradation par le protéasome (Duan et al., 2000; Zhong et al., 2007). Markusic et coll. ont montré que les vecteurs recombinants AAV2, dont les résidus tyrosine 440, 550 et 730 sont remplacés par des résidus phénylalanine, induisent une expression transgénique entre 100 et 1000 fois supérieure dans le foie, après injection intraveineuse chez la souris (Markusic et al., 2010). De façon similaire, Petrs-Silva et coll. ont évalué le transfert de gène dans la rétine de souris à l'aide des vecteurs recombinants AAV2, 8 ou 9, modifiés pour plusieurs résidus tyrosine (Petrs-Silva et al., 2008). Ils ont ainsi montré que le vecteur AAV2y444f modifié pour le résidu tyrosine 444, permet de transduire la presque totalité de la neurorétine après administration intravitréenne de ce vecteur chez la souris adulte. A l'inverse, le vecteur AAV2 non muté administré de façon similaire, permet de transduire uniquement les cellules ganglionnaires de la neurorétine.

- La mutagenèse aléatoire consiste à soumettre différents variants génétiques d'AAV, à une pression de sélection, *in vitro* ou *in vivo*, ce qui favorise l'émergence des variants génétiques les plus efficaces dans le paradigme expérimental :
 - La stratégie, dite de « biopanning », consiste à soumettre un pool de variants génétiques d'AAV à une pression de sélection *in vitro* ou *in vivo*, afin de favoriser leur évolution génétique. Une sélection des variants produits est alors réalisée sur la base de leur tropisme, de leur force de transduction et ou leur activité répliquative dans un ou plusieurs types cellulaires donnés. Ainsi, Koerber et coll. ont produit plusieurs bibliothèques de variants du vecteur AAV2 par différentes techniques expérimentales (mutations aléatoires, peptide display et remplacement aléatoire par DNA shuffling) (Koerber et al., 2009). Ils ont ensuite sélectionné les variants les plus efficaces *in vitro* pour transduire des cellules astrocytaires humaines. L'un des variants sélectionnés, « rAAV.ShH10 », a été ensuite évalué dans la rétine pour déterminer sa capacité à transduire les cellules gliales rétinienne. Ainsi, Klimczak et coll. ont évalué le tropisme du vecteur rAAV.ShH10 dans la rétine de rat après injection intra-vitréenne (Klimczak et al., 2009). Le vecteur rAAV10.ShH10 permet la transduction très efficace et très sélective des cellules de Müller, alors qu'aucun vecteur rAAV isolé et cloné naturellement n'a démontré cette propriété. La mise au point de ce vecteur rAAV10.ShH10 ouvre la voie au transfert de gène thérapeutique dans la rétine de façon peu invasive pour cibler efficacement les cellules de Müller, et pour leur faire exprimer par exemple des facteurs neurotrophiques ou anti-angiogéniques.

- La production des vecteurs AAVr mosaïques consiste à assembler les protéines de la capsid issues de 2 sérotypes différents, pour produire des capsides hybrides. L'objectif de cette stratégie est de cumuler les propriétés biologiques des 2 sérotypes parentaux, et en particulier leur tropisme. Ainsi, Hauck et coll. ont produit un vecteur mosaïque « AAV1.2 » issu de la combinaison des sérotypes AAV1 et AAV2, selon le ratio 50%-50% (Hauck et al., 2003). Le tropisme de ce vecteur AAV1.2 a été évalué par injections locales dans le foie et le muscle chez la souris. Ce vecteur AAV1.2 a montré une bonne efficacité de transduction dans les 2 tissus à l'instar des vecteurs rAAV2 et rAAV1 séparément. Cependant, ces vecteurs mosaïques présentent l'inconvénient de pouvoir être la cible de l'immunité préexistante vis-à-vis des 2 sérotypes parentaux.

2.4.2 Optimisation de la cassette d'expression

L'optimisation des différents éléments codant et régulateurs de la cassette d'expression est souvent nécessaire afin d'optimiser l'expression du transgène et son effet biologique *in vivo*. Les principales stratégies d'optimisation portent sur la transcription, la stabilité des ARNm recombinant, la traduction des ARNm recombinant en protéines, ou encore la stabilité des protéines recombinantes.

2.4.2.1 La transcription

La transcription constitue la principale étape limitante à l'expression cellulaire du transgène. Le choix du promoteur constitue donc le principal levier d'optimisation, car il détermine les cellules dans lesquelles le transgène va s'exprimer, ainsi que le niveau d'expression du transgène, qui ne doit être ni trop faible pour permettre l'effet biologique souhaité *in vivo*.

2.4.2.1.1 Les promoteurs

On distingue deux catégories de promoteurs selon leur profil d'activité *in vivo*. **(1)** Les promoteurs ubiquitaires et constitutifs s'expriment théoriquement dans tous les types cellulaires, indifféremment du niveau de différenciation cellulaires. **(2)** Tandis, que les promoteurs tissus spécifiques ne sont exprimés que dans un seul type cellulaire, ou un nombre réduit de types cellulaires.

2.4.2.1.1.1 Les promoteurs ubiquitaires

2.4.2.1.1.1.1 Les promoteurs ubiquitaires d'origine eucaryote

Dans l'œil, les deux principaux promoteurs ubiquitaires d'origine eucaryote utilisés en transfert de gène thérapeutique ou expérimental, sont les promoteurs dérivés du gène β -actine de poulet (CBA),

et le promoteur composite «CMV early enhancer/chicken β actin promoter» (CAG) (MacLaren, 2009; Niwa et al., 1991; Surace and Auricchio, 2008).

- Le gène CBA code pour l'actine, qui est une protéine ubiquitaire et constitutif du cytosquelette de la plupart des cellules eucaryotes. Le promoteur CBA est donc exprimé fortement par toutes les cellules nucléées (Niwa et al., 1991). Dans la rétine, le promoteur CBA permet une expression forte dans tous les types cellulaires indépendamment du vecteur viral utilisé (Allocca et al., 2007; Cashman et al., 2007).
- Le promoteur CAG est un promoteur composite artificiel. Il a été construit à l'aide de l'enhancer du promoteur CMV, du promoteur CBA, ainsi qu'avec l'intron 1 du gène β globine humaine (Niwa et al., 1991). Niwa et coll. ont montré que ce promoteur CAG permet une expression entre 2 et 17 fois plus importante que le promoteur CBA *in vitro*, après transfection dans différentes lignées cellulaires. Dans l'œil, ce promoteur permet une expression forte et stable dans de nombreux types cellulaires de la rétine, dont les cellules de l'EPR (Acland et al., 2005; Acland et al., 2001). De ce fait, le promoteur CAG a été utilisé au cours des premiers essais cliniques de thérapie génique visant à traiter les DHR, pour contrôler l'expression du transgène thérapeutique RPE65 dans la rétine des patients déficients pour ce gène (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b).

2.4.2.1.1.1.2 Les promoteurs ubiquitaires d'origine virale

Le promoteur CMV est de loin le promoteur ubiquitaire d'origine virale le plus fréquemment utilisé en transfert de gène dans la rétine (Stieger et al., 2010; Surace and Auricchio, 2008). Le promoteur CMV est issu du génome du virus cytomégalovirus humain (CMV), et plus particulièrement de la région régulatrice du gène viral « Immediate Early Gene 1 » (CMV MIEP). La taille et la structure du promoteur CMV recombinant varie généralement peu. Sa taille varie entre 600 et 700pb, tandis que sa structure est toujours composée du promoteur basal du promoteur sauvage CMV MIEP, ainsi que tout ou partie de l'enhancer du promoteur sauvage CMV MIEP. Le promoteur sauvage CMV MIEP et le promoteur recombinant CMV sont schématisés **figure 26**.

Le promoteur CMV recombinant a été utilisé en transfert de gène dans la rétine, afin de déterminer, par exemple, le profil de transduction des différents sérotypes d'AAVr (Ali et al., 1996; Allocca et al., 2007; Lotery et al., 2003; Stieger et al., 2008) ou pour y faire s'exprimer un transgène thérapeutique et évaluer la pertinence d'une stratégie de thérapie génique (Allocca et al., 2008; Gargiulo et al., 2009; Tan et al., 2009). Cependant, ce promoteur a aussi été largement utilisé en thérapie génique clinique humaine pour le traitement de pathologies du système cardiovasculaire par exemple (Habib et al., 1999; Hajjar et al., 2008).

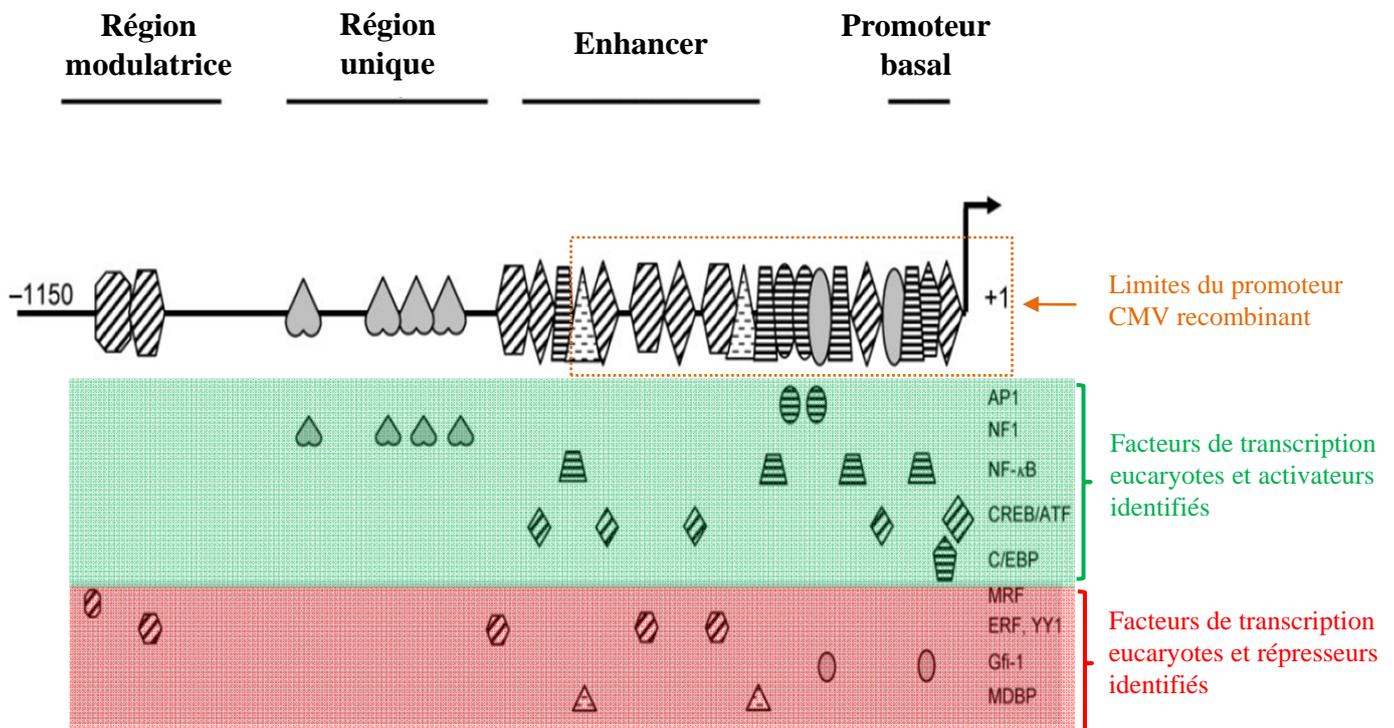


Figure 26. Schéma du promoteur sauvage du gène Immediate Early 1 du virus cytomégalovirus humain (CMV MIEP) et de ses sites de liaison aux facteurs de transcription eucaryote.

Le promoteur sauvage CMV MIEP contrôle l'activité des gènes viraux à expression très précoce (IE72 et IE86) du virus cytomégalovirus humain. Le promoteur sauvage CMV MIEP est constitué de différents éléments génétiques régulateurs : (1) le promoteur basal d'une centaine de paires de base (pb) qui intègre la TATA box et le site d'initiation de la transcription, (2) un enhancer d'environ 500pb et qui permet le recrutement de nombreux facteurs de transcription eucaryotes, et enfin (3) les régions dites « modulatrices » et « uniques » qui font ensemble plus de 1000pb et dont seulement une partie est représentées ici.

Les facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs qui se lient au promoteur sauvage CMV MIEP, et qui régulent son activité transcriptionnelle, sont représentés sur la séquence du promoteur, et classés en fonction de la nature de leur régulation dans ce schéma. Les facteurs de transcription activateurs tels que CREB/ATF et NF-κB sont représentés dans l'encadré à fond vert, tandis que les facteurs de transcription inhibiteurs tel que ERF/YY1, sont représentés dans l'encadré à fond rouge.

Le promoteur recombinant CMV utilisé couramment en transfert de gène est directement dérivé du promoteur sauvage CMV MIEP. Le promoteur recombinant CMV a un taille d'environ 600pb, et ses limites par rapport au promoteur sauvage CMV MIEP, sont représentées par l'encadré orange. Le promoteur recombinant CMV est constitué par le promoteur basal, ainsi que par une grande partie de l'enhancer du promoteur sauvage CMV MIEP. La plupart des sites de liaison pour les facteurs de transcription activateurs CREB/ATF sont conservés.

Illustrations issues de Sinclair and Sissons 2006 Journal of General Virology.

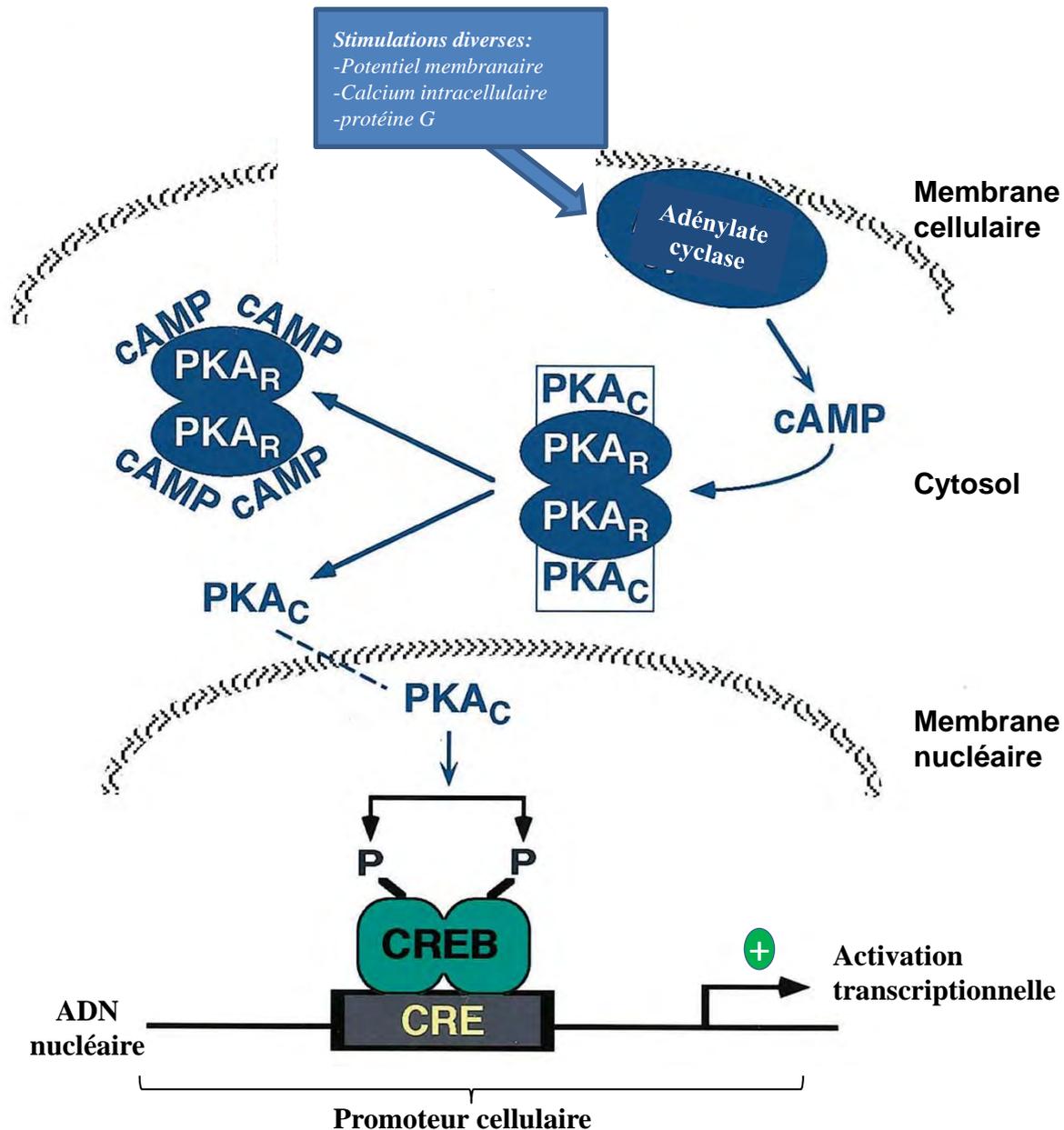


Figure 27A. Schéma de l'activation du facteur de transcription CREB par la voie de signalisation AMPc/PKA.

L'adénylate cyclase peut être activée suite à de nombreux stimuli d'origine cellulaire ou environnementale. Son activation peut être induite par la dépolarisation de la membrane cellulaire, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} , ou encore par l'activation d'une protéine G. Dans les photorécepteurs, la voie de signalisation est activée par l'obscurité et inactivée par la lumière.

L'activation de l'adénylate cyclase induit la production d'AMP cyclique à partir d'ATP. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique (AMPc) induit l'activation de la protéine kinase A (PKA). La PKA est une enzyme tétramérique (2PKAr : 2PKAc), qui est activée par la fixation de molécules d'AMPc sur 2 sous-unités régulatrices (PKAr), ce qui entraîne la dissociation et l'activation des 2 sous-unités catalytiques (PKAc). Les 2 sous-unités catalytiques PKAc sont transloquées dans le noyau, où elles phosphorylent et activent les facteurs de transcription CREB. CREB contribue ensuite à l'activation transcriptionnelle du promoteur

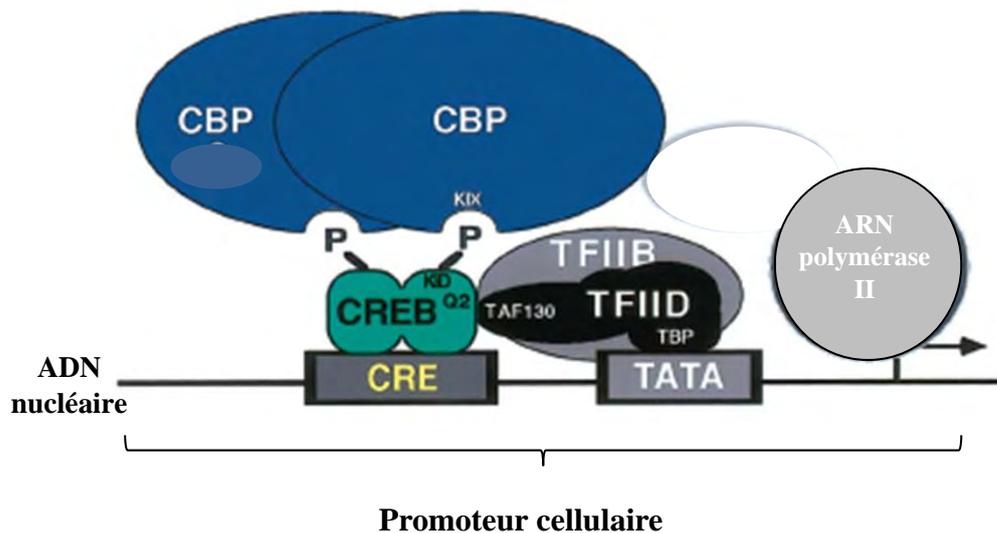


Figure 27B. Schéma du mécanisme d'activation de la transcription, suite au recrutement des facteurs de transcription activateur CREB sur le promoteur d'un gène eucaryote.

Le facteur de transcription « cAMP Responding Element Binding protein » (CREB) se fixe sur le promoteur au niveau des séquences consensus 5'-TGACGTCA-3', CRE (cAMP Responding Element). Ces séquences CRE sont présentes sur de nombreux promoteurs d'origine eucaryote et virale, tel que le promoteur CMV.

Le facteur de transcription CREB est activée par sa phosphorylation (CREB-P), ce qui induit sa dimérisation sur le promoteur et le La phosphorylation de CREB peut être induite par de nombreuses kinases cellulaires dont PKA, PKG et MAPK, qui sont elles-mêmes stimulées par de nombreuses voies de signalisation cellulaire dont la voie de l'AMP cyclique (AMPc).

L'activation de CREB facilite le recrutement de nombreux co-activateurs de la transcription (CBP, TFIIB, TFIID, TAF130...) et la formation du complexe d'initiation de la transcription sur le promoteur.

L'ARN polymérase II peut alors initié transcription du gène et la synthèse d'une molécule ARNm.

Illustrations issues de Shaywitz 1999 Annual Review Biochemistry.

Or plusieurs études ont montré que le promoteur sauvage CMV MIEP est régulé de façon dynamique par un grand nombre de voies de signalisation cellulaires, et de facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs. Hunninghake and al, puis Keller et coll., ont montré que le promoteur sauvage CMV MIEP est régulé par les voies de signalisation de l'AMP cyclique (AMPC), et les facteurs de transcription associées à cette voie de signalisation, c'est-à-dire les facteurs de transcription activateur « cAMP Responding Element Binding protein » (CREB) et « Activating Transcription Factor » (ATF) (**figures 27A et 27B**) (Hunninghake et al., 1989; Keller et al., 2007; Mayr and Montminy, 2001). Or cette voie de signalisation « AMP/PKA/CREB-ATF » est ubiquitaire à la très grande majorité des cellules de l'organisme, et son activation est régulée par une très grande variété d'événements physiologiques ou pathologiques (Johannessen et al., 2004). Or les conséquences de ces régulations sur l'efficacité du transfert de gène, n'ont été étudiées que brièvement dans les cellules endothéliales cardiaques (Salem et al., 2006). Salem et coll. ont montré que la force expression des transgènes évalués sous le contrôle du promoteur CMV, dépend directement de l'activation ou de l'inhibition des récepteurs β adrénergiques et de la voie de signalisation AMPC associée, après transfert de gène dans les vaisseaux coronaires de cochon (Salem et al., 2006). Ils ont aussi montré que l'administration orale de différents agents pharmacologiques de type β bloquant, induit la diminution de l'expression du transgène β galactosidase dans les vaisseaux coronaires. Les auteurs ont ainsi montré une diminution de l'activité enzymatique β galactosidase de 5000 unités internationales par mg de protéine et par minute (UI/mg.min), à environ 250 UI/mg/min après administration du β bloquant.

2.4.2.1.1.2 Les promoteurs spécifiques de la rétine

Il existe de nombreux promoteurs permettant une expression restreinte dans un ou plusieurs type(s) cellulaire(s) de la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. Leur profil d'expression dans la rétine a été évalué *in vivo*, après transfert de gène par vecteur viral, ou dans le contexte d'animaux transgéniques (Surace and Auricchio, 2008).

- Parmi, les promoteurs permettant une expression spécifiques des cellules de l'EPR, le promoteur RPE65 a été utilisé dans de nombreuses études de thérapie génique précliniques et cliniques. Ces études ont eu pour objectif le traitement d'une forme de DHR liée à la mutation du gène « Retinal Pigment Epithelium specific 65KDa protein » (*RPE65*) dont est dérivé ce promoteur RPE65 recombinant (MacLaren, 2009; Stieger et al., 2010). Le gène *RPE65* dont est dérivé ce promoteur est exprimé dans la rétine uniquement dans les cellules de l'EPR, et code pour une enzyme essentielle au cycle des rétinoïdes. Les promoteurs RPE65 recombinants utilisés en transfert de gène sont d'origine humaine, canine, ou murine, et ont une taille variable entre 600 et 1500 pb selon les études (Acland et al., 2005; Bainbridge et al., 2008; Boulanger et al., 2000; Dejneka et

al., 2004; Le Meur et al., 2007; Nicoletti et al., 1998). Leur taille modeste s'accommode bien de la capacité cargo réduite des vecteurs AAVr, et permet une expression forte et stable à long terme dans les cellules de l'EPR (Acland et al., 2005; Bainbridge et al., 2008; Dejneka et al., 2004; Smith et al., 2003). En outre, plusieurs autres promoteurs spécifiques des cellules de l'EPR dont les promoteurs recombinant VDM2 et OA1, ont été évalués avec succès en transfert de gène *in vivo* dans un contexte AAV recombinant. Ces promoteurs recombinant dérivent respectivement du gène codant pour la bestrophine, un récepteur transmembranaire spécifiquement exprimé par les cellules de l'EPR, et du gène OA1 impliqué dans la mélanogénèse (Esumi et al., 2004; Vetrini et al., 2004). Ces deux promoteurs recombinants, OA1 et VDM2, permettent une expression forte et spécifique des transgènes dans l'EPR.

- De même, différents promoteurs s'exprimant spécifiquement dans les photorécepteurs ont été caractérisés en transfert de gène. La plupart de ces promoteurs recombinants dérivent de gènes impliqués dans la cascade de phototransduction ou le cycle des rétinoïde.

Ainsi, Young et coll. puis Khani et coll. ont montré que le promoteur rhodopsine kinase (RK) recombinant court de seulement de moins de 300pb, et dérivant du gène humain rhodopsine kinase, permet une expression spécifique dans les photorécepteurs après injection sous-rétinienne du vecteur AAV5 exprimant l'eGFP (Khani et al., 2007; Young et al., 2003). Sun et coll. ont montré que ce promoteur pouvait être utilisé en thérapie génique pour exprimer de façon efficace et thérapeutique le gène AIPL1 (Aryl-hydrocarbon-interacting protein-like 1) chez la souris déficiente pour AIPL1 et souffrant de DHR (Sun et al., 2010).

Zack et coll. ont développé un promoteur recombinant de plus de 2000 pb dérivé du gène rhodopsine bovin (RHO) (Zack et al., 1991). Ce promoteur RHO permet une expression forte et spécifique dans les photorécepteurs chez la souris transgénique, ou après transfert de gène dans la rétine par électroporation ou injection sous-rétinienne d'un vecteur rAd5 (Bennett et al., 1998; Lee et al., 2010; Zack et al., 1991).

En outre, d'autres promoteurs recombinants ont été développés, afin de permettre une expression restreinte à certains sous-types de photorécepteurs. Ainsi, Beltram et coll. ont montré que le promoteur dérivé du gène opsine de souris (mOP) permettait une expression dans les bâtonnets de façon spécifique (Beltran et al., 2010). En effet, les auteurs ont montré que l'expression du transgène eGFP est restreinte aux bâtonnets dans la rétine de chien, après injection sous-rétinienne d'un vecteur AAV5 dont l'expression est sous le contrôle du promoteur mOP. De façon surprenante, les auteurs ont aussi montré que lorsque le vecteur est administré à une dose supérieur à 5.10^{11} vg, celui-ci induit une expression dans les cônes et les bâtonnets. En parallèle,

d'autres études ont montré que des nombreux promoteurs dérivés des gènes opsine bleu, vert ou rouge, permettent d'induire une expression restreinte à un ou plusieurs sous-types de cônes, après administration sous-rétinienne d'un vecteur AAVr (Glushakova et al., 2006; Komaromy et al., 2008; Li et al., 2008b; Mancuso et al., 2009; Mancuso et al., 2007).

2.4.2.1.1.3 Les systèmes de régulation génique inductibles

Finalement, plusieurs systèmes d'expression génique régulables pharmacologiquement ont été développés expérimentalement afin de pouvoir contrôler l'intensité et la durée d'expression d'un transgène *in vivo*. Les systèmes de régulation tétracycline dépendant, et rapamycine dépendant, constituent les principaux systèmes de régulation génique transposables en clinique (Stieger et al., 2009a; Stieger et al., 2009b). Le système de régulation tétracycline qui a été largement évalué dans l'œil que ce soit chez le petit et gros animal (Auricchio et al., 2002; Stieger et al., 2007), est présenté en détails dans la review en annexe Stieger et coll. 2009 *Advanced Drug Delivery Reviews*. Leur utilisation en thérapie génique est particulièrement pertinente par exemple pour contrôler l'expression de facteurs anti-angiogéniques dans la rétine, afin de traiter les pathologies dégénératives de la rétine associées à une prolifération vasculaires pathologique des vaisseaux choroïdiens et/ou intra-rétiniens (Jager et al., 2008). Ainsi, la régulation de l'expression de ces facteurs anti-angiogéniques permettrait d'optimiser leur effet thérapeutique, tout en évitant les effets délétères associés à une expression trop forte ou trop longue dans le temps de ces facteurs anti-angiogéniques.

2.4.2.2 La stabilité des ARNm recombinants et leur traduction en protéine

L'optimisation de la traduction des ARNm est classiquement obtenue par deux stratégies : l'optimisation des codons et l'ajout d'une séquence consensus Kozack d'initiation de la traduction.

- L'optimisation des codons correspond à la modification de la séquence génétique de la cassette d'expression afin d'augmenter la vitesse de la traduction des ARNm recombinant en protéine. Cette optimisation de codon est réalisée en fonction de l'espèce ou du type cellulaire dans lesquels s'exprime la cassette d'expression. Le caractère dégénéré du code génétique fait que plusieurs codons peuvent correspondre un seul acide aminé, sachant qu'il y a autant d'ARN de transfert (ARNt) qu'il y a de codons. Or la disponibilité cellulaire de ces différents ARNt n'est pas égale dans la cellule, et celle-ci varie en fonction du type cellulaire, de l'espèce, ou encore du stade développemental (Waldman et al., 2010). Ainsi, la composition en codons de la cassette d'expression va déterminer sa vitesse et son efficacité de traduction.

Ainsi, Wu et coll. ont évalué *in vivo*, chez la souris, le bénéfice de l'optimisation de codon pour l'expression d'un vecteur AAVr codant pour le facteur 9 de coagulation humain (hFIX) (Wu et al., 2008). Après injection intraveineuse, la concentration sérique du hFIX chez les souris injectées avec un vecteur optimisé est 3 fois plus grande que chez les souris injectées avec un vecteur non-optimisé, avec 15 000 contre 4 000 ng/mL.

- En outre, l'amélioration de la vitesse de traduction des ARNm en protéines, peut être obtenue en optimisant la séquence d'initiation de la traduction qui est à proximité du codon start AUG dans les ARNm recombinant. Classiquement, la séquence consensus de Kozak est souvent utilisée, car elle correspond à la séquence génétique optimale favorisant l'initiation de la traduction (Kozak, 1989).

En outre, la modification de certains autres éléments génétiques non codants de la cassette permet de moduler l'expression du transgène :

- Le choix de la séquence de polyadénylation (polyA) est déterminant pour optimiser l'expression d'un transgène, étant donné que cette séquence est impliquée dans les mécanismes de la transcription, de l'export nucléaire des ARNm, de la traduction des ARNm, et dans la stabilisation des ARNm. Classiquement, le polyA du gène de l'hormone de croissance bovine (BGH polyA) a été utilisé afin d'augmenter l'expression du transgène que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Yew et coll. ont montré *in vitro* que l'utilisation du BGH polyA permet d'obtenir un niveau de protéine recombinante 3 à 4 fois plus élevé qu'avec un polyA dérivé du virus simien 40 (SV40), après transfection de plasmide recombinant dans une lignée de cellule pulmonaire humaine (CFT1) (Yew et al., 1997).
- L'insertion de séquences régulatrices, telles que les séquences cibles pour les micros ARN ou la séquence WPRE, dans les régions non codantes en 5' et 3' de la cassette d'expression (5'UTR et 3'UTR), permet aussi de moduler de façon importante l'expression du transgène :
 - Ainsi, les séquences « woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element » (WPRE) et « human Beta Globin intron 1 » (β -Globin) permettent d'augmenter significativement l'expression de la cassette d'expression lorsqu'ils sont placés respectivement en 5'UTR et en 3'UTR (Brinster et al., 1988; Donello et al., 1998; Loeb et al., 1999).

Ainsi, Loeb et coll. ont montré que la transduction de cellules HEK293 *in vitro* par un vecteur AAVr exprimant la GFP, aboutit à une expression 10 fois plus grande du transgène, lorsque la cassette d'expression intègre la séquence WPRE (Loeb et al., 1999).

A l'inverse, Pham et coll. ont montré que l'intégration d'une séquence intronique riche en élément AU (AREs) dans la région 3'UTR de la cassette d'expression permet d'augmenter d'environ 50% la vitesse de dégradation des ARNm, *in vitro* dans les cellules HEK293 (Pham et al., 2008).

- En outre, l'inclusion de séquences cible pour les micro-ARN cellulaires (miRNA) dans les séquences 5'UTR ou 3'UTR de la cassette d'expression, permet d'induire la dégradation des ARNm recombinants, ou d'inhiber leur traduction, de façon type cellulaire spécifique. Cette approche permet donc de renforcer la stringence sur le contrôle de l'expression du transgène, imposée par le tropisme du vecteur viral et la spécificité du promoteur (Brown and Naldini, 2009; Brown et al., 2006).

Les miRNA sont des petits ARN simple brin d'environ 20 nucléotides, qui sont exprimés de façon constitutive et en abondance dans toutes les cellules nucléés. Les miRNA permettent de réguler l'expression des gènes endogènes ou exogènes au niveau post-transcriptionnel, en s'hybridant par complémentarité de base sur les ARNm ciblés. Ils induisent alors soit l'arrêt de la traduction, soit le clivage et la dégradation des ARNm ciblés. En outre, les différents miRNA ont des profils d'expression parfois très différents selon le type cellulaire ou l'état de différenciation.

Ainsi, Brown et coll. ont construit un vecteur LTV porteur de séquences cibles pour les miRNA « mir-142-3p », puis ce vecteur a été administré par voie intraveineuse chez la souris. L'intégration de la séquence miR-142-3p dans la cassette d'expression a pour objectif de permettre l'expression du transgène dans les différents organes ciblés (le foie, les muscles et les poumons), mais pas dans les cellules immunocompétentes afin de limiter la réponse immune contre le transgène. En effet, mir-142-3p est exprimé fortement dans les cellules hématopoïétiques dont dérivent les cellules immunocompétentes, mais pas dans les organes ciblés. Les auteurs ont ainsi montré que l'administration du vecteur LTV porteur de séquences cibles pour miR-142-3p, induit *in vivo* une expression forte et stable dans les organes ciblés sur plus de 3 mois chez la souris immunocompétente, tandis que l'administration du vecteur LTV contrôle aboutit à la mise en place d'une réponse immune contre le transgène et à la diminution de son expression *in vivo*.

2.4.2.3 La stabilité des protéines recombinantes

Afin de moduler la concentration intracellulaire des protéines recombinantes, différentes stratégies ont été évaluées pour augmenter leur dégradation par le protéasome, ou à l'inverse pour diminuer leur dégradation par le protéasome.

Ainsi, Li et coll. ont montré qu'il était possible d'augmenter significativement la vitesse de dégradation intracellulaire de la protéine « enhanced green fluorescent protein » (eGFP), en fusionnant l'eGFP le avec domaine C terminale de la protéine murine ornithine décarboxylase (MODC) (Li et al., 1998). Les auteurs ont ainsi montré que l'eGFP déstabilisée (dGFP) ainsi produite, à une demi-vie cellulaire de seulement 2 heures, contre 48 heures pour l'eGFP. En effet, le domaine C de la protéine murine MODC murine ornithine décarboxylase (MODC) induit sa dégradation rapide par le protéasome, sans être ubiquitinée au préalable.

À l'aide du gène rapporteur dGFP, Folliot et coll. ont pu montrer *in vivo* dans la rétine, les variations d'activation transcriptionnelle d'un système de régulation génique tétracycline dépendant (RTtA) suite à l'administration orale d'un analogue de la tétracycline, et donc sa fonctionnalité *in vivo*, (Folliot et al., 2003).

En outre, dans l'un des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, nous avons utilisé la dGFP comme gène rapporteur dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, afin d'observer *in vivo* et par fluorescence, les variations d'expression de différentes cassette d'expression selon les conditions d'exposition à la lumière.

2.5 L'optimisation du protocole d'administration des vecteurs AAVr dans la rétine

Les injections intra-vitréennes et sous-rétiniennes sont les deux principaux modes d'administration intraoculaires des vecteurs AAVr (**figures 24 et 25**). Ces deux modes d'administration permettent schématiquement de transduire d'une part les cellules de l'EPR, les photorécepteurs et les cellules de la couche nucléaire interne (cellules horizontales, bipolaires et amacrines) par la voie sous-rétinienne, et d'autre part les cellules ganglionnaires et éventuellement les cellules de la couche nucléaire interne par la voie intra-vitréenne.

Cependant, ces deux modes d'administration ne permettent généralement pas de transduire les couches nucléaires ciblés sur l'ensemble de la surface de la rétine, mais uniquement dans la région de la rétine immédiatement à proximité du site d'injection (Surace and Auricchio, 2008).

Ces limitations au transfert de gène dans la rétine sont dues principalement à la présence de barrières histologiques dans la rétine s'opposant à la diffusion des vecteurs AAVr dans le parenchyme rétinien

(chapitre 1.2 et 1.3). On présentera ici les stratégies les plus prometteuses pour optimiser le transfert de gène dans la rétine en fonction des voies d'administration intra-vitréenne et sous-rétinienne.

2.5.1 *L'optimisation du mode d'administration intra-vitréen des AAVr*

La diffusion des AAVr depuis l'espace vitréen vers la rétine est limitée par la membrane limitante interne (MLI), qui est une membrane basale complexe. Celle-ci mesure plusieurs centaines de nanomètre d'épaisseur chez l'humain. Elle a pour rôle d'empêcher l'entrée dans la rétine de la plupart des cellules et des macromolécules présentes dans le vitrée (Halfter et al., 2008; Mordenti et al., 1999a).

- Ainsi, Dalkara et coll. ont montré que la déstabilisation enzymatique du vitré et de la MLI chez la souris adulte, permet d'augmenter fortement l'entendue du transfert de gène dans la rétine transduite, après injection intra-vitréenne d'un vecteur AAVr exprimant le gène rapporteur eGFP (Dalkara et al., 2009). Les auteurs ont ajouté l'enzyme pronase dans la solution de vecteur AAVr injectée dans le vitré, et ils ont montré que tous les vecteurs évalués alors permettent la transduction de la rétine (AAV1, AAV2, AAV5 AAV8 et AAV9), alors que seul l'AAV2 le permet en absence de pronase. En outre, la co-administration de pronase avec le vecteur AAV5 permet la transduction partielle des couches internes et externes de la neurorétine, et ceci sur une très grande surface de la rétine. Ce protocole d'administration modifié pour l'AAV5 induit ainsi l'expression sporadique du gène rapporteur eGFP dans les cellules ganglionnaires, mais aussi les cellules de Müller, les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. En outre, Dalkara et coll. ont montré que la co-administration intra-vitréenne de ces vecteurs AAVr avec la pronase à 0,002%, n'induit pas d'altération histologique de la rétine, ni de son activité électrophysiologique évaluée en mesurant par électrorétinogramme (ERG) l'amplitude de la réponse électrique de la rétine vis-à-vis de la lumière.
- En outre, afin de s'affranchir de ces barrières histologiques qui se mettent en place pendant les périodes fœtales et néonatales, l'administration intraoculaire des vecteurs AAVr a été évaluée chez la souris nouvelle née et *in utero* (Dejneka et al., 2004; Surace et al., 2003). Ainsi, Surace et coll. ont évalué le tropisme des vecteurs ssAAV1, ssAAV2 et ssAAV5, après injection intra-vitréenne chez la souris au 14eme jour de développement embryonnaire (E14), à la naissance (PN0) et chez la souris adulte (Surace et al., 2003). L'administration intra-vitréenne de ces vecteurs à E14, aboutit à la transduction forte et étendue des cellules de l'EPR, et de façon plus irrégulière des photorécepteurs, des cellules de Müller, des cellules horizontales, amacrines et ganglionnaires. L'administration intra-vitréenne du vecteur AAV1 en particulier, permet la transduction très efficace de la totalité des cellules de l'EPR, et ceci dans toute la rétine.

L'administration de ces vecteurs plus tardivement, chez la souris nouveau-née, permet principalement la transduction des cellules de l'EPR et des photorécepteurs, que ce soit pour les vecteurs AAV1, 2 ou 5. Finalement, les auteurs ont évalué la fonctionnalité de la rétine des souris adultes injectés à E13, en mesurant l'activité électrophysiologique de la rétine par ERG. Ils ont ainsi pu montrer l'innocuité de leur protocole, la rétine des souris injectées et non injectées ne présentant pas de différence du point de vue de l'amplitude ou la morphologie de leur ERG.

Cependant, il semble difficile de transposer ces approches à l'humain, tant la chronologie du développement oculaire chez l'humain et la souris sont importantes (Finlay, 2008; Fruttiger, 2007; Ponder, 2007; Provis, 2001). En effet, la différenciation de la rétine et la mise en place des différentes couches cellulaires qui la compose, a lieu entre E10 et P15 chez la souris, tandis que chez l'humain ces étapes développementales ont lieu entre la 14^{ème} et 30^{ème} semaine de gestation chez l'humain (Provis, 2001).

De plus, ces stratégies sont associées à des questions éthiques propres à la thérapie génique néonatales, ainsi qu'à des risques traumatiques importants. Parmi les risques potentiellement associés on peut citer : une forte dissémination du vecteur dans le reste de l'organisme, une dilution du transgène à l'âge adulte du fait de la prolifération cellulaire dans la rétine en développement, l'altération de processus développementaux, et un risque pour la survie de la mère et le fœtus (David and Peebles, 2008; Wagner et al., 2009).

2.5.2 L'optimisation du mode d'administration sous-rétinien des AAVr

De la même façon, l'espace sous-rétinien présente différentes barrières histologiques qui s'opposent à la libre diffusion des vecteurs AAVr dans le parenchyme rétinien, et pour lesquelles différentes stratégies expérimentales ont été développées :

- Dans l'espace sous-rétinien, situé entre l'EPR et les photorécepteurs, il existe une matrice extracellulaire constituée de glycosaminoglycanes et de protéines, c'est la matrice inter-photorécepteurs (MIP) (Hollyfield, 1999). Gruter et coll. ont montré que la MIP limite l'efficacité du transfert de gène des vecteurs LTV dans la rétine de souris adulte, en limitant leur diffusion après administration sous-rétinienne (Gruter et al., 2005). Les auteurs ont comparé l'efficacité de la transduction des photorécepteurs suite à l'administration sous-rétinienne d'un vecteur LTV seul, ou avec la co-administration des enzymes « neuraminidase X » ou « chondroitinase ABC ». Ils ont ainsi montré qu'avec la digestion enzymatique de la MIP, le volume de rétine dans lequel les photorécepteurs sont transduits est multiplié par un facteur 5. En outre, les auteurs ont montré que ce protocole n'induit pas de lésions fonctionnelles de la rétine, dont l'activité électrophysiologique a été évaluée par examen ERG.

➤ Au niveau des segments internes des photorécepteurs, il existe une *zonula adhérens* continue dans toute la rétine et formée par les jonctions serrées entre les photorécepteurs et les cellules de Müller. C'est la membrane limitante externe (MLE). La MLE constitue une barrière empêchant la diffusion des macromolécules de plus de 3 nm de diamètre, entre l'espace sous-rétinien et le reste de la neurorétine (Bunt-Milam et al., 1985; Peyman et al., 1971). Ainsi, West et coll., ont montré que la déstabilisation pharmacologique transitoire de cette MLE, permet de faciliter la greffe de précurseurs neuronaux dans la rétine, après avoir injecté ces précurseurs dans l'espace sous-rétinien chez la souris adulte (West et al., 2008). Les auteurs ont montré que l'administration intra-vitréenne de 20ng d'acide α -aminoadipique, 72 heures avant l'injection des précurseurs dans l'espace sous-rétinien, permet d'augmenter le nombre de cellules intégrées dans la neurorétine d'environ 500 sans traitement à 1100 avec traitement. En outre, les auteurs ont montré histologiquement que la déstabilisation transitoire de la MLE n'est pas délétère pour la rétine et n'induit pas sa dégénérescence.

Pour conclure, l'administration systémique des vecteurs AAVr chez le nouveau-né pourrait constituer une stratégie alternative pour transduire différentes structures de l'œil, dont la rétine. En effet, plusieurs études ont montré que l'administration systémique du vecteur scAAV2/9 chez la souris, le chat et le macaque, aboutit à la transduction efficace et extensive de plusieurs organes, dont le cerveau et la moelle épinière (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009; Foust et al., 2010). Ceci est en partie expliqué par l'immaturation des barrières conjonctives et endothéliales à la naissance, en particulier la barrière hémato-méningée, et par la capacité de l'AAV9 à franchir ces barrières. Or la barrière hémato-méningée est très similaire histologiquement et fonctionnellement à la barrière hémato-rétinienne (Cunha-Vaz, 1979; Steuer et al., 2005; Zlokovic, 2008).

De ce fait, Il nous a semblé pertinent d'évaluer si ce vecteur scAAV2/9 a aussi la capacité de franchir la barrière hémato-rétinienne, et de transduire la rétine, après administration systémique à la naissance. Les résultats de cette étude sont présentés dans la partie Résultat de ce manuscrit. **(Joussemet and Belbellaa soumis dans Gene Therapy).**

En outre, la précocité de l'administration d'un tel vecteur thérapeutique serait pertinente pour le traitement de pathologies rétinienne syndromiques, dont le déclenchement a lieu souvent dès les premiers mois de la vie chez l'humain, en particulier dans le cas des maladies de surcharge lysosomale.

3 Thérapie génique pour le traitement des dégénérescences héréditaires de la rétine

Au cours de ce chapitre, les avancés et les limites de la thérapie génique pour le traitement des DHR seront illustrées à travers les principales pathologies (syndromiques et non syndromiques) qui ont fait l'objet d'étude précliniques et cliniques de thérapie génique. De ce fait, la thérapie génique pour le traitement des DHR non syndromiques sera illustré par les principales études relatives aux mutations des gènes *RPE65* et *RHO*, tandis que le traitement par thérapie génique des DHR syndromiques sera illustrés par les principales études relatives aux MPS et la maladie de Batten.

3.1 Le traitement des DHR non syndromiques

3.1.1 Le traitement des DHR non syndromiques à transmission autosomique récessive

La thérapie génique pour le traitement des DHR non syndromiques autosomiques récessives (DHR AR), a connue des avancées majeurs au cours de la dernière décennie, en particulier avec les premiers essais cliniques pour traiter la forme d'ACL associée à la mutation du gène *RPE65* (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b). De plus, plusieurs succès thérapeutiques ont aussi été accompli dans des modèles animaux de RP, causées par la mutation de gènes impliqués dans le cycle des rétinoïdes (Batten et al., 2005), la cascade de phototransduction (Alexander et al., 2007; Boye et al., 2010; Haire, 2006; Komaromy et al., 2010; Mancuso et al., 2009; Sun et al., 2010), le cytosquelette des photorécepteurs (Ali et al., 2000), et la matrice extracellulaire de la neurorétine (Park et al., 2009).

Les mutations du gène *RPE65* sont de loin celles qui ont été les plus étudiées en thérapie génique (Stieger et al., 2010). Le gène *RPE65*, ou « retinal pigment épithélium specific 65 KDA protein », code pour une enzyme exprimée dans la rétine, exclusivement dans les cellules de l'EPR. Cette enzyme est nécessaire au cycle des rétinoïdes, et contribue au recyclage des photopigments après leur activation par la lumière (**figure 4**). La perte de cette enzyme chez la souris (Pang et al., 2006; Redmond et al., 1998), le chien (Aguirre et al., 1998) ou chez l'humain (Lorenz et al., 2000), aboutit à un déficit en photopigment et à une détérioration de la fonction visuelle, ainsi qu'à la dégénérescence progressive de la rétine, puis à la cécité totale chez l'humain entre 20 et 40 ans. La pertinence et l'efficacité de la thérapie génique pour traiter les DHR AR associées à ces mutations, a été démontrée par plusieurs études menées chez le chien ou la souris déficiente pour l'enzyme *RPE65* (Acland et al., 2001; Bennicelli et al., 2008; Jacobson et al., 2006; Le Meur et al., 2007; Narfstrom et al., 2003).

Les études menées chez la souris ont évalué l'effet thérapeutique de l'injection sous-rétinienne d'un vecteur AAVr codant pour RPE65. La restauration de la fonction visuelle et la préservation histologique de la rétine ont constitué les principaux critères évalués pour déterminer l'efficacité thérapeutique (Lai et al., 2004; Pang et al., 2010; Pang et al., 2006). Ces études se distinguent entre elles par le type de vecteur AAVr utilisé, soit de sérotype 2 ou 5, et soit de type simple brin (ssAAV) ou double brin (scAAV).

Dans l'étude de Lai et coll., un vecteur ssAAV2 codant pour le gène *RPE65* a été injecté chez la souris KO RPE65 $-/-$ à l'âge de 21 jours (PN21). Ils ont ainsi montré que l'expression de l'enzyme RPE65 perdure dans l'EPR jusqu'à 18 mois post-injection, et que l'expression du photopigment opsine augmente uniquement dans la rétine des souris traitées (Lai et al., 2004). En outre, Lai et coll. ont mesuré l'activité électrophysiologique de la rétine des souris traitées et non traitées par la méthode de l'électrorétinogramme (ERG). L'ERG consiste en l'enregistrement de l'activité électrique de la rétine à l'aide d'électrodes extra-oculaires, et en réponse à des stimuli lumineux d'intensités variables. A deux mois, post-injection, l'amplitude de l'ERG des souris traitées était environ 50 à 70% plus élevée que celle des souris non traitées, montrant ainsi une préservation fonctionnelle de la rétine. Cependant, Lai et coll. ont montré qu'à 7 mois post-injection, il n'y a plus de différences d'amplitude d'ERG entre souris traitées et non traitées. En outre, la vitesse de dégénérescence des photorécepteurs s'est révélée identique chez les souris non-traitées et les souris traitées avec le vecteur ssAAV2.

Dans étude ultérieure, Pang et coll. ont évalué l'effet thérapeutique d'un vecteur ssAAV5, administré dès PN14, chez la souris rd12 porteuse d'une mutation naturelle dans le gène *RPE65* (Pang et al., 2006). Les auteurs ont montré une bonne préservation histologique et fonctionnelle de la rétine des souris traitées, jusqu'à 7 mois post-injection. Les souris traitées ont ainsi des photorécepteurs en plus grand nombre et les segments externes internes des photorécepteurs sont d'aspect normal à 7 mois post-injection, contrairement aux souris non traitées dans les photorécepteurs sont très diminués, et dont les segments internes et externes sont atrophiés et mal formés. En outre, l'activité ERG des souris traitées a été mesurée à 200 μ V d'amplitude, alors que celle des souris non traitées est quasi nul, et celle des souris normales à environ 400 μ V. Cette dernière étude montre que le bénéfice thérapeutique obtenu à l'aide d'un vecteur ssAAV5 est supérieur à celui obtenu à l'aide d'un vecteur ssAAV2, ce qui est cohérent avec plusieurs études qui ont montré que l'efficacité du transfert de gène dans la rétine obtenue avec un vecteur ssAAV5 est supérieure à celle obtenue avec un ssAAV2 (Lotery et al., 2003; Yang et al., 2002).

Récemment, Pang et coll ont conduit une étude chez la souris rd12, mais en utilisant un vecteur double brin scAAV5 qui permet une expression plus forte et plus rapide du transgène dans la rétine

(Pang et al., 2010; Petersen-Jones et al., 2009; Yokoi et al., 2007). L'administration sous-rétinienne de ce vecteur à P14 aboutit à la restauration stable et presque complète de l'amplitude de l'ERG pour les bâtonnets et les cônes. A 6 mois post-injection, l'amplitude des ERG des souris traitées est d'environ 300 μ V, contre 20 μ V pour les souris non traitées, et 400 μ V pour les souris normale. En outre, le traitement de ces souris à PN14, aboutit aussi à la préservation du nombre de photorécepteurs, et plus particulièrement des cônes. En parallèle, Pang et coll. ont évalué l'efficacité de ce traitement à P35 quand la dégénérescence de la rétine a commencée, et ils ont montré une restauration fonctionnelle moins importante que celle obtenue à PN14 en particulier pour la faction des cônes. Ils ont ainsi ont montré que l'efficacité thérapeutique est d'autant plus grande que l'administration du vecteur est effectué précocement.

Ainsi, ces trois études semblent indiquer que la qualité de la restauration fonctionnelle et anatomique de la rétine, est dépendante de la précocité et de l'efficacité du transfert de gène dans la rétine (Lai et al., 2004; Pang et al., 2010; Pang et al., 2006).

Les études portant sur le modèle canin ont utilisé les vecteurs ssAAV2 et ssAAV4, codant pour le gène *RPE65* humain ou canin. Il est important de noter que la dégénérescence de la rétine débute plus tardivement chez le chien que chez la souris. La diminution du nombre des photorécepteurs commence environ 1 an après la naissance, tandis que l'activité ERG diminue pour être plate vers 6 à 9 mois (Narfstrom et al., 1989). Dans toutes ces études, le traitement des chiens malades a été réalisé plusieurs mois après la naissance (entre 3 et 30 mois). Il a abouti dans toutes ces études à la préservation histologique de la rétine, ainsi qu'à une restauration importante de la fonction visuelle.

Ainsi, Le Meur et coll. ont ainsi montré que l'administration du vecteur AAV2/4.hrpe65 entre 8 et 12 mois après la naissance aboutit à : **(1)** La préservation de la structure des segments internes et externes des photorécepteurs. **(2)** La restauration de l'activité électrique de la rétine qui est de 100 μ V à 12 mois post-injection, contre 10 μ V chez les chiens non traités. **(3)** La capacité des chiens à se déplacer à travers un parcours d'obstacles contrairement aux chiens non traités (Le Meur et al., 2007). En outre, cette étude a montré l'existence d'une fenêtre thérapeutique au-delà de laquelle (après 30 mois d'âge), l'administration du vecteur AAV2/4.hrpe65 n'induit plus de bénéfice thérapeutique. De plus, ces différentes études n'ont pas mises en évidence d'effets délétères à ce transfert de gène à court ou long terme.

L'innocuité de cette approche fut confirmée dans deux autres études évaluant la toxicité et la bio distribution de ces vecteurs après administration sous-rétinienne chez le chien et le primate (Jacobson et al., 2006; Provost et al., 2005).

Chez l'homme, trois essais cliniques ont été réalisés récemment pour traiter des patients porteurs d'une mutation dans le gène *RPE65* (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b). Au cours de ces trois études, un vecteur ssAAV2 codant pour le gène *RPE65* a été injecté chez 18 patients âgés de 8 à 44 ans, chez qui aucun effet délétère n'a été observé. Pour chaque patient, le vecteur fut injecté en sous-rétinien, et uniquement dans l'œil disposant de la fonction visuelle la plus altérée. L'innocuité du traitement a été confirmée chez tous les patients, et un bénéfice thérapeutique significatif a été montré dans les essais cliniques de Maguire et coll. et Bainbridge et coll. (Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b).

Ainsi dans l'étude de Maguire et coll., le traitement du patient CH08 âgé de 9 ans, a induit l'augmentation du champ visuel dans son œil traité par au moins un facteur 3, une amélioration de son reflexe pupillaire de plusieurs millimètres d'amplitude, une amélioration par un facteur 100 de la sensibilité à la lumière perçue, et ainsi qu'une diminution de la fréquence des nystagmus par un facteur 2 (Maguire et al., 2009). En outre, 90 jours après le traitement du patient CH08, celui-ci a retrouvé sa capacité à se déplacer dans un parcours fléché.

Ces restaurations de la fonction visuelle sont très impressionnantes mais incomplète, ceci a été expliqué par l'avancement important de la dégénérescence rétinienne même chez les jeunes patients. En outre, il est probable que le transfert de gène réalisé dans seulement un tiers de la rétine de ces patients, ne permettent pas un effet thérapeutique optimal. De ce fait, quatre pistes peuvent être proposées pour améliorer l'efficacité thérapeutique de ces protocoles. **(1)** Traiter les patients plus précocement avant l'apparition des lésions cellulaires et fonctionnelles irréversibles dans la rétine. **(2)** Optimiser l'efficacité du transfert de gène dans les cellules d'intérêts, en utilisant un vecteur AAVr dont l'efficacité de transduction est plus grande. **(3)** Augmenter le niveau d'expression du transgène thérapeutique, en optimisant les différents éléments génétique régulateurs de la cassette d'expression, et en particulier le promoteur. **(4)** Optimiser le mode d'administration du vecteur thérapeutique dans la rétine, afin de transduire un maximum de cellules de l'EPR.

3.1.2 Le traitement des DHR non syndromiques à transmission autosomique dominante

De nombreuses études de thérapie génique ont porté sur le traitement des DHR autosomiques dominantes (DHR AD), mais à ce jour, aucune n'a montré un succès thérapeutique complet à l'image de ce qui a pu être accompli pour certaines formes de DHR autosomique récessive (DHR AR), telles que celle associée à la mutation *RPE65*. Parmi les DHR AD, les mutations dominantes du gène *RHO* sont de loin celles qui ont été le plus étudié. Elles représentent environ 25% des DHR AD, et constituent une cible médicale majeure (Audo et al., 2010; Hartong et al., 2006). Les mutations

dominantes de *RHO* se traduisent au niveau des photorécepteurs bâtonnet, par une altération de la structure et de la fonction du photopigment rhodopsine, et plus particulièrement au niveau de sa structure tertiaire, de son transport vers le segment externe des photorécepteurs, ou de ses propriétés d'inactivation après capture d'un photon. De ce fait, les mutations du gène *RHO* altèrent significativement la capacité des photorécepteurs à détecter la lumière et à s'y adapter, tout en induisant l'apoptose des bâtonnets et des cônes.

Les principales stratégies de thérapie génique développées pour traiter ces mutations *RHO* ont pour objectif commun, de supprimer l'expression de la forme mutante et délétère de *RHO* par l'expression *in situ* d'ARN interférentiels (ARNi) ou encore de ribozymes. Les ARNi s'hybrident par complémentarité de base sur les ARNm recombinant, et induisent l'inhibition de la traduction des ARNm recombinant en protéines, soit en empêchant la progression du complexe d'élongation de traduction, soit en induisant le clivage des ARNm. Les ribozymes sont des molécules d'ARN à activité catalytique. Les ribozymes ont la capacité de s'hybrider avec les ARNm qui leur sont complémentaires, puis de les cliver.

- Le groupe du Dr. Jane G. Farrar a développé l'utilisation d'ARNi dirigés contre l'expression des gènes humains *RHO* normaux et porteurs d'une mutation dominante (Chadderton et al., 2009; O'Reilly et al., 2007). *In vitro*, ces ARNi ont montré leur capacité à réduire l'expression des ARNm *RHO* humains à 20% de leur niveau initial. *In vivo*, l'expression des ARNm *RHO* endogènes a été réduite à 10% après injection sous rétinienne d'un vecteur ssAAV5 chez des souris transgéniques exprimant exclusivement le gène *RHO* humain. Une diminution similaire a été observée chez la souris transgénique Pro347Ser. Ces souris transgéniques Pro347Ser expriment le gène humain *RHO* mutant, ainsi que le gène *RHO* murin normal. Finalement, afin d'évaluer le bénéfice thérapeutique de cette approche, les souris transgéniques Pro347Ser ont reçu en sous-rétinien un vecteur ssAAV5 exprimant ces ARNi ciblant spécifiquement les ARNm humains *RHO* mutants. A 1 et 3 mois post-injection, Chadderton et coll. ont montré un ralentissement de la dégénérescence des photorécepteurs. En effet, même si la densité des photorécepteurs continue à décroître rapidement chez les souris traitées, elle reste environ 2 fois plus grande chez les souris traitées que chez les souris non-traitées. De plus, Chadderton et coll. ont montré une préservation partielle de l'activité électrophysiologique de la rétine des souris traitées à 3 mois post-injection. L'amplitude de l'activité ERG a été mesurée à environ 400µV chez les souris traitées, contre seulement environ 100µV chez les souris non traitées. Cette préservation histologique et fonctionnelle est d'autant plus impressionnante que moins de 25% de la rétine a été transduites par le vecteur et exprime les ARNi thérapeutiques (Chadderton et al., 2009).

- Le groupe du Dr. William W. Hauswirth a développé l'utilisation de ribozymes pour dégrader spécifiquement les ARNm *RHO* porteurs d'une mutation dominante (Drenser et al., 1998; Lewin et al., 1998). *In vitro*, ces ribozymes sont capables de dégrader 80% des ARNm *RHO* porteurs de la mutation P23H, en 24 heures, sans induire la dégradation des ARNm *RHO* normaux. En outre, l'efficacité thérapeutique de ces ribozymes a aussi été évaluée dans une lignée de rats transgéniques porteurs de la mutation P23H (Lewin et al., 1998). Lewin et coll. ont injecté en sous-rétinien un vecteur ssAAV2 exprimant ces ribozymes à PN14/PN15, juste avant le début de la dégénérescence des photorécepteurs (Lewin et al., 1998). A 47 jours post-injection, les auteurs ont montré que l'administration du vecteur induit une diminution de seulement 10 à 20% du niveau des ARNm porteurs de la mutation P23H, chez les rats traités. Cependant, Lewin et coll. ont observé une bonne préservation des photorécepteurs dans toute la rétine des rats traités, avec une épaisseur de la couche des photorécepteurs d'environ 35 μm chez les rats traités, contre seulement 20 μm environ chez les rats non traités. En outre, Lewin et coll. ont aussi montré que l'administration du vecteur thérapeutique permet de préserver partiellement l'activité électrophysiologique des rétines traitées. Ainsi, à PN90, les rats traités avec le vecteur thérapeutique présentent une activité environ 2 fois plus grande que celle des rats non traités, avec 230 μV contre 100 μV .

Ainsi dans ces deux séries d'étude, le bénéfice de ces approches thérapeutiques a été au-delà de la région de la rétine directement transduite par le vecteur. Cependant, dans ces deux séries d'études, la préservation histologique et fonctionnelle de la rétine a été partielle et transitoire. On peut supposer que ce manque d'efficacité thérapeutique, malgré le caractère très promoteur de ces approches, est principalement causé par une efficacité de transfert de gène insuffisante dans la rétine des animaux traités :

- La voie d'administration sous-rétinienne des vecteurs AAVr ne permet pas de traiter plus d'un tiers de la rétine malade. Ceci limite le bénéfice thérapeutique à une fraction des cellules malades. En outre, la persistance d'un environnement dégénératif dans le reste de la rétine, pourrait être délétère à long terme pour la fraction de la rétine traitée.
- L'efficacité de transduction des vecteurs ssAAV2 et ssAAV5 utilisés dans ces études, ne permet pas une expression rapide et forte du transgène thérapeutique dans la rétine. Ceci semble pourtant crucial dans ces pathologies dégénératives, pour prévenir les lésions anatomiques et fonctionnelles irréversibles de la rétine. De ce fait, l'utilisation des vecteurs scAAV8 ou scAAV9 dont la vitesse et la force de transduction sont beaucoup plus forte, pourrait augmenter significativement l'efficacité thérapeutique de ces stratégies thérapeutiques.

De ce fait, il semble essentiel d'améliorer l'efficacité du transfert de gène thérapeutique dans la rétine, ainsi que son niveau d'expression, afin d'assurer le succès des prochaines études portant sur le traitement des DHR AD.

3.2 Le traitement des DHR syndromiques

Les DHR syndromiques, et en particulier les maladies métaboliques, ont fait l'objet de nombreuses études expérimentales de thérapie génique. Dans ces études, les auteurs se sont principalement intéressés aux atteintes potentiellement létales du système nerveux central, du système cardiovasculaire, du système musculosquelettique, et des organes tels que le foie, les poumons... (Haskins, 2009; Koeberl et al., 2009; Kyriakouli et al., 2008). Cependant, très peu d'études ont été consacrées à l'évaluation de protocole de thérapie génique pour soigner les atteintes de la rétine, qui pourtant peuvent aboutir à une perte sévère de la fonction visuelle (Rajappa et al., 2010).

Ceci est particulièrement bien illustré pour les mucopolysaccharidoses et pour la maladie de Batten, qui affecte aussi bien le cerveau que la rétine. En effet, dans les deux essais cliniques de thérapie génique portant sur le traitement de la maladie de Batten réalisés par le groupe du Dr. Ronald G Crystal, seule la dégénérescence de l'encéphale a été traitée par injection intracérébrale d'un vecteur AAVr thérapeutique, tandis que la dégénérescence de la rétine n'a pas été adressée (Hackett et al., 2005; Sondhi et al., 2007; Sondhi et al., 2008). A l'inverse, le développement de stratégies de thérapie génique pour le traitement de certaines DHR syndromiques, tel que pour le syndrome d'Usher, ont été évaluées uniquement dans la rétine, alors que ce syndrome affecte aussi sévèrement l'oreille interne et les reins (Gargiulo et al., 2009; Hashimoto et al., 2007; Summers, 2009).

3.2.1 le traitement des mucopolysaccharidoses

Parmi les maladies métaboliques affectant la rétine, les mucopolysaccharidoses (MPS) sont parmi les plus étudiées en thérapie génique, car elles ont dans leur ensemble une prévalence de 1 individu pour 7000, et elles sont fortement handicapantes et souvent mortelles pour les patients avant leurs 30 ans. En effet, les MPS entraînent des atteintes progressives du système nerveux centrale, des muscles et du squelette, du cœur, jusqu'à entraîner la défaillance de ces organes. Les MPS affectant la rétine, ont une fréquence d'environ 1 individu sur 25 000.

Le traitement traditionnel des MPS consiste à modifier l'alimentation des patients pour limiter l'accumulation délétère des métabolites toxiques, ou à l'inverse à enrichir l'alimentation en métabolites déficients. Cependant, l'avènement des méthodes de production de protéines recombinantes a permis la mise au point de stratégie d'enzymothérapie pour le traitement de ces

pathologies. L'enzymothérapie consiste à administrer de façon répétée, la forme recombinante de l'enzyme déficiente chez le patient, afin de suppléer le déficit en enzymes endogènes. Cependant, cette stratégie est particulièrement coûteuse, induit la mise en place d'une réponse humorale, et ne permet pas traiter l'accumulation de métabolites toxiques dans le système nerveux central, et dans l'œil du fait la présence des barrières hémato-méningées et hémato-rétiniennes.

De ce fait, la thérapie génique semble être une approche particulièrement pertinente pour le traitement de ces pathologies, en faisant exprimer directement dans les organes malades, l'enzyme déficiente. En outre, les MPS présentent plusieurs caractéristiques qui pourraient faciliter le développement de stratégie de thérapie génique :

- Les mécanismes physiopathologiques, de même que les gènes causals, sont très souvent bien identifiés.
- Une restauration même très partielle de l'activité enzymatique lysosomale est suffisante pour améliorer drastiquement l'état physiologique des sujets traités (Barton et al., 1991; Kakkis et al., 2001; Schiffmann et al., 2000).
- En outre, ces enzymes lysosomales peuvent être produites et secrétées par une petite fraction de cellules, mais induire une restauration fonctionnelle dans toutes les cellules avoisinantes par le mécanisme dit de « cross correction » ou « sécrétion-recapture ». En effet, les enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire, peuvent être capturées et internalisées par les cellules avoisinantes *via* leurs récepteurs mannose-6-phosphate. Ces enzymes sont ensuite dirigées vers le lysosome où elles restaurent une activité enzymatique normale (Braulke and Bonifacio, 2009; Haskins, 2009).
- Finalement, la thérapie génique *in vivo* permet de produire l'enzyme déficiente directement dans le système nerveux central et dans l'œil, pour y avoir un effet thérapeutique. Or, l'enzymothérapie par voie intraveineuse ne permet pas de traiter les atteintes de ces organes qui sont isolés du reste de l'organisme respectivement par les barrières hémato-méningée et hémato-rétinienne.

Ainsi plusieurs études de thérapie génique ont porté sur le traitement des mucopolysaccharidoses de type I, II, III, IV, VI et VII qui se traduisent par des atteintes musculosquelettiques, respiratoires et du système nerveux central et parfois des atteintes oculaires (Ellinwood et al., 2004; Haskins, 2009; Sands and Davidson, 2006). Ces études ont été réalisées pour la plupart sur des modèles de souris Knock-out (KO) ou porteuses d'une mutation naturelle (Ellinwood et al., 2004). Dans une

minorité de ces études, les protocoles de thérapies ont été développés dans les modèles canins et félins de MPS I, qui sont des porteurs naturels d'une mutation pour l'enzyme α -L-iduronidase (IDUA) (Haskins, 2009). Les modèles murins permettent d'évaluer facilement le bénéfice thérapeutique d'une stratégie de thérapie génique, du fait du nombre d'animaux important que l'on peut intégrer dans un protocole de recherche. Cependant, les modèles gros animaux sont nécessaires pour se rapprocher d'un contexte clinique humain à plusieurs points de vue, tel que la taille de l'organisme, la masse et le volume des tissus à soigner, la dose de vecteur thérapeutique à administrer beaucoup plus grande, l'évaluation d'effets délétères et ou encore des éventuelles réponses immunologiques...etc.

De ces études ressortent 3 stratégies thérapeutiques majeures :

- La première stratégie consiste à prélever des cellules hématopoïétiques souches chez le malade, afin de les transduire *ex vivo* avec un vecteur intégratif codant pour l'enzyme déficiente, avant de greffer ces cellules modifiées chez le sujet malade. Cette stratégie thérapeutique repose sur le concept thérapeutique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques hétérologues (CSH) issus d'un donneur sain et compatible HLA, pour pouvoir remplacer ou suppléer les CSH endogènes malades. Cette stratégie a montré cliniquement une certaine efficacité thérapeutique pour traiter les patients atteints de MPS I, en diminuant les inclusions intracellulaires, la vitesse des dégénérescences tissulaires, et en ralentissant l'évolution des atteintes motrices et cérébrales (Grigull et al., 2005; Hobbs et al., 1981). En effet, la greffe de CSH hétérologues permet la dissémination de ces cellules dans presque tous les organes, et participent à la clairance des accumulations de métabolites délétères dans le milieu extracellulaire, ainsi qu'à la correction du phénotype intracellulaire des cellules avoisinantes par le phénomène de sécrétion-capture.

Dans le cas de la greffe de cellules souches autologues mais génétiquement modifiés *ex vivo*, il est possible de s'affranchir de la recherche de donneurs potentiellement compatible HLA, et donc des réactions de rejet immunitaire complexes. Ces stratégies de thérapie *ex vivo*, ont été évaluées dans différents modèles pathologique de MPS I, III, VI, et VII, principalement chez la souris (Soper et al., 2001; Zheng et al., 2003; Zheng et al., 2004). Cependant, cette stratégie est souvent associée à un traitement myéloablatif plus ou moins agressif. De plus, la greffe de ces cellules ne permet pas de traiter systématiquement les atteintes cérébrales et squelettiques du fait de leur faible accessibilité.

- La seconde stratégie thérapeutique consiste à administrer directement un vecteur viral recombinant thérapeutique de type AAVr, LTV ou γ RV, dans les organes atteints, tels que le cerveau, afin de prévenir ou de ralentir les lésions tissulaires et fonctionnelles. Cette stratégie

présente l'avantage majeur de pouvoir faire abstraction des barrières hémato-méningées et hémato-rétinienne. Ainsi, contrairement à la greffe de CSH ou à l'enzymothérapie, l'administration intraoculaire ou intracérébrale d'un vecteur viral thérapeutique permet de traiter efficacement les dégénérescences oculaires et cérébrales chez la souris MPS VII et MPS III B, sans induire de réactions immunes majeurs chez les sujets traités (Brooks et al., 2002; Fu et al., 2002; Hennig et al., 2004). Cependant, cette approche suppose le traitement de tous les organes périphériques, soit par la greffe de CSH autologues modifiées génétiquement, soit par injections locales multiples du vecteur thérapeutique dans tous les organes atteints (Heldermon et al., 2010). Cette dernière approche présente le risque de stimuler le développement de réponses immunes fortes contre le vecteur et le transgène thérapeutique, et donc de compromettre l'expression à long terme du transgène thérapeutique.

- La troisième stratégie consiste à administrer par voie intraveineuse un vecteur viral recombinant thérapeutique AAVr, LTV ou γ RV, codant pour l'enzyme déficiente. Cette stratégie présente l'avantage de pouvoir transduire efficacement un certain nombre d'organes, dont le foie, les poumons, le cœur ou encore les muscles squelettiques, pour lesquels le phénotype cellulaire est alors corrigé. En outre, les organes transduits vont à leur tour, sécréter l'enzyme recombinante dans la circulation sanguine pour corriger le phénotype des organes non transduits (Cardone et al., 2006; Kobayashi et al., 2005; Kosuga et al., 2000; Traas et al., 2007). Cependant, cette approche semble difficilement applicable chez les patients adultes pour plusieurs raisons : **(1)** Les lésions tissulaires et fonctionnelles irréversibles commencent généralement dans les deux premières années de la vie et progressent rapidement au cours de l'enfance (Sands and Davidson, 2006). **(2)** Les populations adultes disposent fréquemment d'une pré-immunité contre les vecteurs viraux, et leur système immunitaire mature peut induire des réactions délétères pour l'expression à court et long terme du transgène (Lutzko et al., 1999; Shull et al., 1996a; Shull et al., 1996b). De ce fait, de nombreuses études de thérapie génique chez l'animal, ont évalué l'administration néonatale ou *in utero* pour permettre : **(1)** Le traitement de la déficience enzymatique, avant la mise en place des lésions tissulaires et fonctionnelles irréversibles. **(2)** La mise en place d'une tolérisation vis-à-vis du transgène et des cellules transduites, du fait de l'immaturation du système immunitaire, et donc de permettre l'expression à long terme du transgène thérapeutique. **(3)** La transduction de tout l'organisme avec une dose de vecteur viral qu'il soit réaliste d'imaginer produire.

Ainsi, Traas et coll. ont évalué le bénéfice thérapeutique de l'administration intraveineuse d'un vecteur γ RV thérapeutique, codant pour l'enzyme IDUA, chez le chien MPS I nouveau-né déficient pour l'enzyme IDUA, (Traas et al., 2007). Les chiens traités ont été évalués jusqu'à 1,8 ans post-

injection, et ont montré une diminution importantes des symptômes associés à MPS I par rapport à des chiens non-traités. D'une part, la concentration sérique en enzyme IDUA ([IDUA]) chez les chiens traités a été stabilisée à une concentration 700 supérieure par rapport celle des chiens malades non traités, et 28 fois supérieure par rapport celle des chiens sains. En outre, l'activité enzymatique de l'IDUA dans différents organes, tel que le foie, la rate, le cerveau ou le cœur, a été stabilisé entre 20% et 1000% de l'activité enzymatique normale de l'IDUA chez le chien sain. Enfin, le niveau d'accumulation tissulaire des glycosaminoglycanes a été ramené à niveau 1 à 2,6 supérieur à celui des chiens sains, contre un niveau 17 à 108 fois supérieur chez les chiens non traités. D'autre part, les atteintes oculaires, et en particulier l'opacification cornéenne, présente chez les chiens non traités, furent largement réduites chez les chiens traités. De plus, les chiens traités ne présentent pas les malformations faciales et squelettiques qui sont caractéristiques du chien MPS I, et qui affectent particulièrement la cage thoraciques et les articulations. Cette étude particulièrement encourageante, a mis cependant en évidence la faiblesse du transfert de gène dans le cerveau avec moins d'une copie de vecteur viral thérapeutique pour 100 cellules.

De ce fait, il semble important de développer de nouveaux vecteurs viraux plus efficace pour transduire le système nerveux central, ou de nouveaux protocoles d'administration systémique chez le nouveau-né, permettant aux vecteurs viraux de franchir efficacement la barrière hémato-méningée et hémato-rétinienne. Dans ce but, nous avons évalué au cours de cette thèse le tropisme oculaire des vecteurs AAVr chez le rat et chien, après administration systémique chez le nouveau-né ou chez l'adulte. Ces travaux sont présentés dans la partie Résultat de ce manuscrit.

À ce jour, aucun essai clinique n'a été conduit pour le traitement des mucopolysaccharidoses par thérapie génique.

3.2.2 le traitement de la maladie de Batten

Parmi les maladies de surcharge lysosomale, seule la maladie de Batten a bénéficiée de deux essais cliniques. Ces deux essais cliniques sont conduits par le groupe du Dr. Ronald G Crystal.

La maladie de Batten est une pathologie neurodégénératives de l'enfant et de l'adulte, qui se caractérise principalement par une atrophie de l'encéphale, une altération des fonctions cognitives, mentales et motrices, ainsi que par la dégénérescence de la rétine (Mole, 1999). La maladie de Batten est causée par le dysfonctionnement du métabolisme lysosomal et l'accumulation intracellulaire de matériel auto fluorescent de type lipofuscine.

Jusqu'à récemment il n'existait pas de modèle animal préclinique de la maladie de Batten. De ce fait, le groupe du Dr. Crystal a initialement évalué la toxicité et l'efficacité de l'expression de leur

vecteur thérapeutique (AAV2_{cu}hCLN2) par injections intracérébrales de celui-ci chez le primate et le rat (Hadaczek et al., 2010), Le vecteur thérapeutique correspond à un vecteur ssAAV2 codant pour l'enzyme lysosomale tripeptidylpeptidase I (TPP1) sous le contrôle du promoteur CAG. Celui-ci a été injecté en 12 points chez le primate et le rat, au niveau des 2 hémisphères et plus précisément au niveau du cortex frontal, pariétal, et occipital. Ce protocole de thérapie génique n'a pas montré de toxicité majeure ni chez le primate, ni chez le rat, et il a permis l'expression soutenue du transgène thérapeutique dans une très grande proportion de l'encéphale. C'est seulement en 2004 que Sleat et coll. ont produit une lignée de souris Knock-Out mutée pour le gène CNL2, qui reproduit le phénotype pathologique humain (Sleat et al., 2004). Ainsi Passini et coll. *al* ont pu montrer le bénéfice thérapeutique de l'administration intracérébrale de ce vecteur AAV2_{cu}hCLN2 chez la souris CLN2^{-/-}, avec la diminution des inclusions auto fluorescentes dans le cerveau (Passini, 2006).

Au cours du premier essai clinique, le groupe du Dr. Crystal a traité à l'aide du vecteur AAV2_{cu}hCLN2, 10 enfants âgés de 3 à 10 ans qui présentaient une progression avancée des lésions cérébrales (Worgall et al., 2008). Chaque enfant a reçu 12 injections intracérébrales pour une dose de vecteur totale d'environ 3.10^{12} vecteurs génomes (vg). L'évolution de la dégénérescence cérébrale des enfants traités a été suivie sur 1,5 an, par imagerie médicale (IRM). L'évolution de ces lésions montra un ralentissement faible, mais pas l'arrêt dans la progression des dégénérescences cérébrales et des fonctions cognitives et motrices. Ainsi, la vitesse de progression de l'atrophie de la matière grise encéphalique chez les patients traités a été mesurée à $-2.6\% \pm 0.7\%$ par an, contre $-2.84\% \pm 1.3\%$ par an chez les patients non traités. De plus, un ralentissement de l'augmentation de l'hypertrophie ventriculaire a aussi été observé avec $+14.0\text{cm}^3 \pm 4.1\text{cm}^3$ par an chez les patients traités, contre $+17.2\text{cm}^3 \pm 4.7\text{cm}^3$ par an chez les patients non traités. Finalement, les patients traités ont montré une meilleure évolution du score clinique pour les atteintes neurologiques évaluées sur l'échelle de Hamburg, qui mesure les capacités verbales, motrices et les attaques épileptiques (Steinfeld et al., 2002). En outre, malgré l'absence d'inflammation intracérébrale suite à l'administration de ce vecteur, les auteurs ont observé l'augmentation importante et systématique du titre d'anticorps anti-AAV2 chez tous les patients traités, pendant presque 1 an post injection. Le titre maximum d'anticorps neutralisant a été mesuré entre 1/160 et 1/320, entre 1 et 26 semaines post-injection. En outre, la procédure chirurgicale entraîna de nombreux événements délétères chez les patients, parmi lesquels des épisodes épileptiques et des détresses respiratoires.

Afin d'améliorer le bénéfice thérapeutique de cette approche, le groupe du Dr. Crystal procède actuellement à un second essai clinique, qui inclut l'utilisation d'un vecteur AAV10 au lieu d'un vecteur AAV2 (ClinicalTrials.gov Identifiant NCT01161576). En effet, l'administration locale de vecteur AAV10 dans le cerveau a été décrite comme induisant la transduction d'un plus grand

volume de tissu, et permettrait une expression plus forte du transgène thérapeutique (Cearley and Wolfe, 2007; Sondhi et al., 2007). Ainsi Sondhi et coll. ont montré que l'administration intracérébrale d'un vecteur ssAAV10 codant pour TPP1 chez la souris adulte CLN2^{-/-}, aboutit à une expression de l'enzyme dans une plus grande partie de cerveau, avec environ 2mm³ après injection du vecteur ssAAV2, contre 20mm³ après injection du vecteur ssAAV10 (Sondhi et al., 2007). En outre, l'administration du vecteur ssAAV10 thérapeutique induit une diminution des inclusions tissulaires auto fluorescentes par un facteur 2, et une amélioration importante des fonctions motrices. Cependant, l'administration de ce vecteur chez la souris adulte n'augmente que de très peu la survie des souris traitées. En effet, les souris traitées survivent en moyenne jusqu'à 23 semaines d'âge, contre seulement 17 semaines en l'absence de traitement. A l'inverse, Sondhi et coll. ont montré dans une étude récente que plus l'injection a lieu précocement, plus le bénéfice thérapeutique n'est important du point de vue de la survie de souris traitées et de la correction de leur phénotype malade (Sondhi et al., 2008). Ainsi, Sondhi et coll. ont montré que l'administration intracérébrale d'un vecteur ssAAV10 codant pour TPP1, chez la souris CLN2^{-/-} nouveau-né à PN2, permet l'expression de TPP1 dans presque tout l'encéphale. En outre, le niveau de l'activité enzymatique TPP1 a été mesuré comme homogène dans tout l'encéphale, et à un niveau proche de celui mesuré chez la souris sauvage. De plus, les auteurs ont observé la disparition presque totale des inclusions auto fluorescentes intracérébrales chez les souris traitées à PN2. En outre les souris traitées à PN2 montrent une préservation presque totale des capacités motrices, et en particulier dans les tests d'équilibre et d'effort, avec moins de 10% de différence entre les souris traitées et les souris sauvage. Enfin, Sondhi et coll. ont montré que le traitement à PN2 permet d'augmenter considérablement l'espérance de vie moyenne des souris à plus d'un an, contre moins de 4 mois pour les souris non traitées.

Ces différentes études réalisées chez la souris semblent indiquer que le bénéfice thérapeutique de ces approches est d'autant plus important que le traitement a lieu précocement, avant la mise en place des différents symptômes. Ceci semble avoir des conséquences drastiques du point de vue la survie, sur l'apparition d'atrophie encéphalique, et sur la préservation des fonctions motrices. En outre, ces études semblent aussi indiquer que le succès thérapeutique de ces approches dépend fortement de la capacité du protocole d'administration du vecteur thérapeutique, à induire l'expression de l'enzyme TPP1 dans tout l'encéphale, de la façon la plus étendue possible, et cela à un niveau proche du niveau physiologique. De ce fait, il est probable que le bénéfice thérapeutique des prochains essais clinique soit largement dépendant de l'efficacité du transfert de gène dans l'encéphale et de la précocité du traitement.

4 Objectif de la thèse : optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteur AAV.

À ce jour, les AAV recombinants constituent les vecteurs de choix pour le transfert de gène thérapeutique dans la rétine, et ceci pour les différentes raisons qui ont été évoquées au cours de l'introduction. En outre, ces vecteurs ont montré leur potentiel thérapeutique dans de nombreuses études de thérapie génique précliniques réalisées dans des modèles animaux de DHR.

Au demeurant, les essais cliniques de thérapie génique chez les patients atteints de DHR connaissent des succès plus modérés par rapport à ce qui a été observé dans les études précliniques, comme cela a été illustré plus haut dans l'introduction (chapitre 3.1). Ce constat nous amène, entre autres, à nous poser la question de l'efficacité des protocoles de thérapie génique utilisés actuellement en clinique, et de leur optimisation pour améliorer le bénéfice thérapeutique en clinique humaine.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs AAVr, avec pour finalité de pouvoir optimiser celui-ci. J'ai travaillé principalement sur 2 paramètres qui constituent souvent un frein à l'efficacité thérapeutique des protocoles de thérapie génique *in vivo* : l'efficacité du transfert de gène dans la rétine, et la stabilité ou le niveau d'expression des transgènes *in vivo* et à long terme.

4.1 Optimisation du protocole d'administration des vecteurs AAVr.

Nous avons étudié la possibilité d'augmenter l'efficacité de transduction de la rétine, et plus particulièrement la surface rétine transduite, suite à une administration unique de vecteur AAVr, en changeant la voie d'injection locale intraoculaire au profit d'une administration par voie systémique.

En effet, la capacité à transduire un maximum de cellules d'intérêts, et donc à y apporter le transgène thérapeutique, va largement conditionner le succès d'un protocole de thérapie dans la rétine, comme dans d'autres organes. Or, les protocoles d'administration locale de ces vecteurs AAVr ne permettent pas de transduire plus d'un tiers de la surface totale de la rétine. Ceci est d'autant plus vrai que seule l'administration sous-rétinienne des vecteurs AAVr permet de cibler efficacement les cellules de l'EPR et les photorécepteurs. Or, ce mode d'administration limite le transfert de gène, et donc le bénéfice thérapeutique, uniquement aux cellules directement présentes dans la zone d'injection sous-rétinienne du vecteur. Ceci a pour conséquence qu'il n'est pas possible de traiter plus d'un tiers de la surface totale des rétines chez les patients atteints de DHR, chez qui la rétine est fragilisée, et chez qui il faut donc limiter le volume de vecteur injecté.

Or, l'œil est l'un des organes les plus vascularisés de l'organisme, et l'administration intraveineuse permettrait potentiellement d'avoir accès à la totalité de la surface de la rétine, et dans les deux yeux simultanément, contrairement au protocole d'injection sous-rétinien, qui, en outre, correspond à un geste chirurgical bien plus complexe.

En outre, cette étude a été initiée sur la base de plusieurs publications récentes dont une est issue de notre laboratoire (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009; Foust et al., 2010). Ces différentes études ont montré la capacité des vecteurs AAVr injectés par voie intraveineuse à transduire de nombreux organes périphériques, mais aussi à franchir la barrière hémato-méningée et à transduire le système nerveux central de façon efficace et étendue, et ceci largement au-delà de ce que permettent les protocoles d'injection locale dans ces organes (Cearley and Wolfe, 2007; Dodiya et al., 2010; Glatzel et al., 2000).

De ce fait, il nous a semblé pertinent d'évaluer le tropisme oculaire de différents sérotypes de AAVr après leur administration par voie systémique. Afin d'optimiser l'efficacité de ce transfert de gène, nous avons opté pour des vecteurs de type scAAV qui permettent généralement une meilleure expression du transgène dans les cellules transduites, que les vecteurs de type ssAAV. En outre, nous avons aussi évalué l'effet de l'âge administration de ces vecteurs sur l'efficacité du transfert de gène dans l'œil, afin de prendre en compte la maturation de barrière hémato-rétinienne qui est incomplète à la naissance mais mature à l'âge adulte, à l'instar de la barrière hémato-méningée dont elle est très proche d'un point de vue anatomique et fonctionnelle. Nous avons réalisé cette étude chez le rat, puis chez le chat et le chien, dont la physiologie est plus proche de celle de l'humain que de celle du rat, et chez qui on dispose de modèles de DHR.

4.2 Évaluation de la stabilité de l'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents promoteurs, dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

Cette seconde étude a été initiée sur la base d'observations préliminaires réalisées il y a quelques années par un ancien étudiant en thèse dans notre équipe, Knut Stieger. Il avait étudié dans la rétine la fonctionnalité d'un système de régulation génique de type TetOn, basé sur le trans-inhibiteur TetR-KRAB et le promoteur CMV. Malgré l'induction pharmacologique de ce système d'expression il avait alors observé une diminution de l'expression du gène rapporteur dGFP dans la rétine des rats, de façon corrélée à la durée d'éclairage dans l'animalerie rongeur.

Après une étude bibliographique approfondie, j'ai émis l'hypothèse que l'activité transcriptionnelle du promoteur CMV dans les photorécepteurs, et éventuellement dans les cellules de l'EPR, pourrait être directement modulée par la lumière et l'obscurité. En effet, les conditions de lumière modulent directement l'activation de la cascade de phototransduction dans les

photorécepteurs (Burns and Arshavsky, 2005), et indirectement plusieurs voies de signalisation cellulaire dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR (Farber et al., 1981; Zhang and Cote, 2005). Or ces mêmes voies de signalisation ont été décrites dans d'autres contextes expérimentaux comme potentiellement activatrice du promoteur CMV (Salem et al., 2006; Sinclair and Sissons, 2006).

Nous avons ainsi comparé l'expression de gènes rapporteurs dGFP ou Érythropoïétine dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, lorsque ceux-ci sont sous le contrôle du promoteur CMV ubiquitaire, ou sous le contrôle des promoteurs rhodopsine ou rhodopsine kinase qui sont spécifiques des photorécepteurs. J'ai ainsi étudié le profil et le niveau d'expression de ces gènes rapporteurs lorsque les rats injectés avec les vecteurs AAV correspondant, sont placés dans 2 conditions de lumière pendant plusieurs jours consécutifs : soit en éclairage alterné classiquement trouvé en animalerie rongeur (11h lumière : 13h obscurité, **L/O**), soit en éclairage continu (lumière 24 heures/24, **L/L**).

La pertinence de cette étude repose sur le fait que le promoteur CMV est un promoteur utilisé couramment en transfert de gène chez l'animal que ce soit pour évaluer le tropisme d'un nouveau vecteur AAVr (Ali et al., 1996; Allocca et al., 2007; Lotery et al., 2003; Rolling et al., 1999) ou pour évaluer l'efficacité thérapeutique d'un transgène dans la rétine (Lau and Flannery, 2003; Tan et al., 2009).

RESULTATS

1ere ETUDE

Systemic delivery of scAAV9 in newborn rats and dogs results in gene transfer to rpe cells in the retina.

Béatrice Joussemet^{1,4,#}, Brahim Belbellaa^{1,4}, Alexandra Mendes-Madeira¹, Delphine Briot-Nivard¹, Thomas Bucher¹, Yan Cherel², Philippe Moullier^{1,3}, and Fabienne Rolling¹.

¹INSERM UMR U649, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

²INRA UMR U703, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Nantes, France

³Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

⁴The first two authors contributed equally to this work.

Systemic delivery of scAAV9 in newborn rats and dogs results in gene transfer to RPE cells in the retina

Béatrice Joussemet^{1,4,#}, Brahim Belbellaa^{1,4}, Alexandra Mendes-Madeira¹, Delphine Briot-Nivard¹, Thomas Bucher¹, Yan Cherel², Philippe Moullier^{1,3}, and Fabienne Rolling¹.

¹INSERM UMR U649, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

²INRA UMR U703, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Nantes, France

³Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

⁴The first two authors contributed equally to this work.

(#) Correspondence should be addressed to B.J.

Dr B Joussemet, PhD

Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649

Institut de Recherche Thérapeutique 1

Université de Nantes

8 quai Moncoussu

44007 Nantes Cedex 01, France.

Fax: (33) 2 28 08 04 16

Tel: (33) 2 40 08 04 15

e-mail: beatrice.joussemet@univ-nantes.fr

Running title : Systemic delivery of scAAV9 transduces RPE cells

Words count = 3437 + (2x500) = 4437

Abstract

Systemic delivery of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors has recently been shown to efficiently target cells of the central nervous system. The purpose of our study was to evaluate gene transfer in the retina after self-complementary (sc) rAAV systemic delivery in rats and dogs. Sc AAV serotype 1, 5, 6, 8, and 9 carrying a CMV-driven green fluorescent protein (GFP) were injected intravenously in rats, and transgene expression was analyzed by fluorescence fundus photography and histological examination. Neonatal rats injected with scAAV2/9 vector displayed the strongest GFP expression in the retina, within the retinal pigment epithelium (RPE) cells. No transgene expression was detected in the retina of adult-injected rats. We next evaluated the capacity of the scAAV2/9.gfp vector to transduce the retina of newborn and adult dogs after intravenous delivery. Interestingly, efficient gene transfer was observed in the RPE and tapetal cells in newborn-injected animals but no transduced RPE cell was detected in adult-injected dogs. The ability of scAAV9 vector to transduce RPE cells after neonatal systemic delivery makes this approach potentially interesting for screening therapeutic transgenes in animal models of retinal diseases.

Keywords: AAV9; systemic injection; retina; RPE; dog; rat

Introduction

Recombinant adeno-associated viruses (rAAV) are among the most efficient gene delivery vehicles for therapeutic gene transfer *in vivo* especially because they can transduce many tissues with a safe, strong and long-term expression of the transgene in different large animal models.¹⁻³

Recently, several studies have shown that systemic injection of single strand (ss) AAV2/9 vectors was highly efficient to mediate extensive and sustained transduction of many organs in mice,⁴ in dogs⁵ and in non-human primates.⁶ Even injected into extravascular spaces, ssAAV2/9 vectors could cross complex endothelial and conjunctive barrier, and subsequently target the liver, skeletal muscles, heart, and pancreas.⁷

More interestingly, self complementary (sc) AAV2/9 vector has been described to cross efficiently the blood brain barrier (BBB) in mice and in cats and to transduce many neuronal cells throughout the central nervous system (CNS).⁸⁻¹⁰ Indeed, a single intravenous injection of scAAV2/9 mediated extensive gene delivery in the neocortex, the hippocampus, the cerebellum and the spinal cord, whereas direct rAAV administration in the brain or in the spinal cord resulted in a more localized gene transfer.^{11,12} Moreover, two recent studies have shown functional and survival rescue in spinal muscular atrophy mouse models following scAAV9-mediated gene delivery.^{10,13} In these latter studies, the efficiency of neuronal cell transduction seems to be higher when the scAAV2/9 vector was delivered during the neonatal period in mice.^{9,10} The fact that double strand AAV vectors were used, probably contributed to increase the efficiency of gene transfer in the whole central nervous system.¹⁴

Interestingly, the blood retinal barrier (BRB), which is composed of the retinal RPE-Choroid interface and the intra-retinal vessels, is functionally and anatomically very similar to the BBB.^{15,16} Thus, it seems relevant to evaluate the capacity of the scAAV2/9 vector to cross the BRB and to transduce the retina.

In this study, we investigated retinal gene transfer after intravenous (i.v.) delivery of scAAV2/9 vector in both newborn and adult rats and dogs. Our results indicate that following neonatal systemic delivery, scAAV2/9 transduced the retinal pigmented epithelium (RPE) cells in the retina, opening interesting perspectives for the treatment of retinal diseases.

Results

Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn rats results in GFP expression in the RPE cells

We administered scAAV2/1, 5, 6, 8 and 9.gfp vectors in the temporal vein of 10 newborn Sprague Dawley rats at postnatal day 1 (PN1) (n=2 for each serotype tested ; Table 1) and monitored green fluorescent protein (GFP) expression in the retina by fluorescence fundus photography (Figure 1). The GFP signal was detected in the retina of animals injected with scAAV2/5.gfp (Figures 1a and b), scAAV2/8.gfp (Figures 1c and d) and scAAV2/9.gfp (Figures 1e and f), as early as three weeks post-injection (Figures 1a, c and e). No GFP signal was observed by fluorescence fundus photography in rats injected with scAAV2/1.gfp or scAAV2/6.gfp (data not shown).

In animals injected with scAAV2/5.gfp, scAAV2/8.gfp or scAAV2/9.gfp, transgene expression was observed all over the eye fundus as speckled fluorescent spots, increasing in size and intensity between three and 10 weeks post-injection (Figure 1). Rats injected with scAAV2/9.gfp vector displayed the strongest fluorescence intensity (Figures 1e and f) whereas only a weak retinal GFP signal was detected in scAAV2/5.gfp and scAAV2/8.gfp injected rats, at three weeks (Figures 1a and c) or 10 weeks (Figures 1b and d) post-injection.

Subsequently, we administered scAAV2/8.gfp and scAAV2/9.gfp vectors in the jugular vein of four adult Sprague Dawley rats at PN90 (n=2 for each serotype tested ; Table 1). In contrast to results obtained after neonatal vector delivery, no GFP signal was observed in the eye fundus of any of the injected adult rats, at three or 10 weeks post-injection (data not shown).

In order to accurately determine the types of retinal cells expressing GFP and the extent of

transduction, we analyzed the retinas of the injected rats with fluorescence microscopy at three months post-injection.

In the retina flatmounts of the rats injected at PN1 with scAAV2/9.gfp, GFP expression was observed within the choroid/RPE layer (Figures 2a and b), but not within the neuroretina (Figure 2c). Retina sections of rats injected at PN1 with scAAV2/9.gfp vector clearly displayed GFP expression in the RPE cells, but not in the other retinal cells (Figures 2d-f). Interestingly, approximately one to four RPE cells out of 10 expressed GFP, and these transduced RPE cells were distributed over the entire retina. Retina sections of uninjected rats from the same litter did not show any GFP signal (Figures 2g-i).

No GFP signal was detected in the retina flatmounts of rats injected at PN90 with the same vector, thus confirming our initial observations by fluorescence fundus photography (data not shown).

Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn and adult dogs results in GFP expression in the posterior segment of the eye

We then evaluated the capacity of scAAV2/9.gfp vector to transduce the retina of newborn and adult dogs, after i.v. delivery. For this purpose, we injected two dogs at PN1 and two dogs at PN60 (Table 2) and monitored ocular GFP expression by fluorescence fundus photography. We observed a strong GFP expression in the eye fundus of dogs injected at PN1 (Figure 3b), as well as in dogs injected at PN60 (Figure 3d). As expected, no specific fluorescence signal was detected in the eye fundus of the age-matched uninjected control dogs (Figures 3a and c). The intensity of the fluorescence remained stable over a three month post-injection period (time of the

experiment) for all injected animals, at the exception of the dog D3 (data not shown). For the dog D3, fundus GFP signal was present during the first 30 days after vector administration, but then disappeared 15 days after discontinuation of the immunosuppressive regimen which was poorly tolerated (at 45 days post-vector injection).

Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in dogs leads to the transduction of RPE and tapetal cells in newborns, but only of tapetal cells in adults

Retina sections of dogs injected at PN1 with scAAV2/9.gfp vector were analyzed at three months post-injection using fluorescence microscopy. These displayed GFP expression in the tapetal and in the RPE cells, but not in the other retinal cells (Figures 4a-c). In order to confirm that RPE cells were transduced, retina sections were immunolabeled for RPE65 which is specifically expressed in RPE cells. Co-localization of GFP signal with RPE65 labeling was clearly observed with fluorescence microscopy (Figures 4g-i). Approximately two to four out of 10 RPE cells were transduced, and interestingly, they were distributed only over the tapetal area of the retina (Figures 4a-c), but not outside (Figures 4d-f). As a control, retina sections of uninjected dogs from the same litter did not show any GFP signal (Figures 4j-l).

Retina sections of dogs injected at PN60 with scAAV2/9.gfp vector, clearly showed transgene expression in almost all the tapetal cells, but not in the retina (Figures 5a-f). Absence of RPE cell transduction was confirmed by the absence of colocalization of RPE65 labeling with GFP signal (Figures 5g-i).

Immunosuppressive treatment is necessary to maintain long term GFP expression in the tapetal cells of dogs treated at eight weeks of age

In order to determine if the loss of GFP expression observed in the dog D3 could result from an immune reaction, the presence of GFP-specific antibodies was evaluated by Western Blot in the sera of all the injected dogs, at two months post scAAV2/9.gfp administration.

As expected, GFP-specific antibodies were detected in the serum of the dog D3 (Figure 3e), but not in the sera of dogs D1 and D2 injected at PN1, or in the serum of the dog D4 also injected at PN60 but continuously immunosuppressed.

These results correlate the loss of GFP signal observed in the retina of the dog D3, with the development of an adaptive immune response directed against the GFP protein, upon the discontinuation of the immunosuppressive regimen at 30 days post-injection. In contrast, transgene expression persisted up to three months post-injection (time of the experiment) without any immunosuppressive regimen for dogs D1 and D2 injected at PN1.

We also evaluated the development of immune response against rAAV9 capsid, two months after vector administration. We detected rAAV9 neutralizing antibodies in the sera of all the injected dogs, independent of the age of the animal at the time of injection and the immunosuppressive regimen (Table 2). Nevertheless, the dog D3, whose immunosuppressive treatment was discontinued, presented the highest titer (1/1000), whereas the dog D4, injected at PN60 and continuously immunosuppressed, and the dogs D1 and D2 injected at PN1, displayed a lower anti-rAAV9 titer (1/50-1/100).

Discussion

This study shows that neonatal i.v. injection of scAAV2/9.gfp vector results in sustained transgene expression in the RPE cells of rats and dogs. Surprisingly, no transduced RPE cells were detected when the scAAV2/9.gfp vector was injected in adults. Consistent transgene expression was found in the tapetal cells of both newborn and adult-injected dogs.

We observed an efficient transduction of RPE cells in newborn rats when scAAV2/9.gfp was delivered systemically, compared to the other scAAV serotypes tested, scAAV2/1, 5, 6, and 8. The scAAV2/9-mediated RPE cell transduction was observed over the whole retina. We also detected a strong transgene expression in a large proportion of RPE and tapetal cells in dogs, after neonatal scAAV2/9 vector administration. This efficient retinal transduction mediated by the scAAV9 serotype could be the consequence of a distinct capsid structure and thus of specific cellular receptors or co-receptors.¹⁹ In fact, the rAAV9 serotype has shown serological characteristics distinct from other serotypes previously described.²⁰ Another possible explanation could be a higher stability of the scAAV9 particles compared to the other serotypes. Indeed the ssAAV2/9 vector has been shown to have slower clearance from the blood circulation compared to ssAAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 vectors after i.v. injection.⁴ Moreover, ssAAV2/9 has been described in several contexts to efficiently bypass conjunctive and endothelial barriers.^{4,7-10} Interestingly, a conjunctive barrier within the eye known as the Bruch's membrane (BM), separates the RPE from the choriocapillaris, which is the dense vascular layer directly beneath the RPE layer.²¹ Thus, it could be expected that the BM restricts scAAV-mediated retinal transduction after systemic delivery except for the scAAV9 serotype.

Transduction of RPE cells in newborn rats and dogs, is consistent with the fact that the blood supply of the retina is mainly performed by the choriocapillaris vessels which are fully developed in newborns.²² On the other hand, the absence of any transduced neuroretinal cells in injected newborns could be the consequence of the immaturity of the intra-retinal vascular network in newborns rats and dogs.²²⁻²⁴

Interestingly, in newborn dogs injected with scAAV2/9.gfp, RPE cells were transduced over the entire anatomic region where the RPE and the tapetum lucidum are associated. No transduced RPE cells were found outside the tapetal area of the retina. We hypothesize that, in this region, the BM has a higher permeability for scAAV2/9 extravasation from the choriocapillaris toward the RPE, since the BM has been described to be thinner in the tapetal area than in the non-tapetal area.²⁵

Surprisingly, in adult animal injected i.v. with scAAV2/9 vectors, no transduced RPE cells were found in the retina of rats and dogs. However, scAAV2/9.gfp administration led to an extensive transduction of the tapetum lucidum present only in dogs.

These results could indicate a change of scAAV2/9 tropism for RPE cells, between newborn and adult retina, due to a modification of RPE surface proteins during the postnatal period.²⁶ Such differences in scAAV2/9 tropism, between newborns and adults, have been previously observed in many organs, including the retina, in mice, after systemic delivery of ss and scAAV2/9 vectors.^{9,10,27}

These age-related differences could also be attributed to major differences in the BM structure and composition between newborns and adults. Indeed, the two collagenous and the elastic layer

present in the BM, are immature at the time of birth, in many species such as the mouse, rat, and cat.²⁸⁻³⁰ They become progressively denser and more complex a few weeks after birth, thus making the RPE less accessible from the choriocapillaris. On the other hand, the strong transduction of the tapetum in injected adult animals, as well as in the newborns, is consistent with the fact that the tapetum is traversed and highly perfused by the choriocapillaris vessels which are very permeable.^{23,31}

In injected adult animals, the absence of any transduced cells in the neuroretina, despite their fully developed vasculature, suggests that scAAV2/9 is not able to reach the neuroretina through the RPE layer, or to efficiently bypass the BRB formed by the tight junctions between the endothelial cells of the retinal vessels.¹⁵

Another difference, between neonatal and adult i.v. scAAV2/9 injections, is the necessity to use immunosuppressive regimen in dogs injected at two months of age in order to maintain long-term transgene expression. In contrast, no immunosuppressive regimen was needed in neonatal-injected puppies, whose retinal transgene expression was stable up to three months following vector administration. These results could be explained by a relative immaturity of the newborn's immune system, especially with lower blood lymphocyte count and weaker lymphocyte response to stimulation with mitogen.³² A reduction of cellular costimulatory molecule expression in newborns could also be responsible of clonal deletion after neonatal antigen delivery.³³ More specifically to viral gene transfer, a strong cellular immune reaction was already observed after direct scAAV2/9 muscle injection in adult dogs but not in neonatal dogs in which systemic delivery of scAAV2/9 resulted in persistent skeletal muscle transduction throughout the body without CD4⁺ and CD8⁺ T-cell infiltration.⁵ It has been recently shown that neonatal gene

transfer could allow successful re-administration of ssAAV vectors in a canine model of a metabolic disease.³⁴

Interestingly, while neonatal scAAV2/9 delivery was able to avoid immune reaction directed against the transgene, a specific adaptive immune response against rAAV9 capsid was detected in all injected dogs, independently of the age of injection. This immune response had no impact on the transgene expression but could probably prevent successful re-administration of the vector.

In conclusion, we have demonstrated the potential of scAAV2/9 vector injected intravenously to mediate vector delivery into RPE cells throughout the retina, especially in large animals. This approach may enable the screening of potentially interesting therapeutic transgenes by neonatal scAAV2/9 vector administration in different animal models of retinal diseases and could open interesting perspectives in gene therapy for metabolic diseases affecting multiple organs including the retina.

Materials and Methods

Animals

Pregnant and adult 90-day old (PN90) female Sprague Dawley rats were purchased from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). Post-natal day 1 (PN1) and PN60 Beagle dogs were obtained from the Boisbonne Centre at Nantes Veterinary School. Experiments were approved by the regional ethics committee and carried out according to European guidelines for the care and the use of experimental animals.

Vectors

Pseudotyped scAAV vectors were generated by packaging AAV2-based recombinant self-complementary (sc) genomes into AAV1, 5, 6, 8, and 9 capsids as previously described,³⁵ at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>). The pCMV-gfp sc plasmid used for the production of scAAV.gfp vectors was described earlier.⁸ Physical particles were quantified by dot blot hybridization and vector titers are expressed as vector genomes per milliliter (vg/ml).

In vivo scAAV intravenous injections

PN1 rats were rested on a bed of ice for anesthesia, and then injected in the temporal vein with 1×10^{12} vg/kg of either scAAV2/1.gfp (n=2), scAAV2/5.gfp (n=2), scAAV2/6.gfp (n=2), scAAV2/8.gfp (n=2) or scAAV2/9.gfp (n=2), in a volume of 50 to 70 μ l.

PN90 rats were anesthetized with ketamine/xylazine, and then injected in the jugular vein with 1×10^{12} vg/kg of scAAV2/8.gfp (n=2) or scAAV2/9.gfp (n=2) vector encoding GFP, in a volume of 1-2 ml.

PN1 puppies (n=2) and PN60 dogs (n=2) were anesthetized with isoflurane, and then injected in the jugular vein with 1×10^{12} vg/kg of scAAV2/9.gfp vector in a volume of 1-2 ml.

Following vector administration, injected adult animals were immunosuppressed with mycophenolate mofetil (MMF ; 20 mg/kg/day ; Cell Cept, Roche Pharmaceutical, Palo Alto, CA) combined with cyclosporine (CyA ; Neoral, Novartis Pharma, Rueil Malmaison, France) whose dosage was adjusted once a week in order to maintain cyclosporinemia above 100 ng/mL.

In vivo fluorescence fundus photography and retina flatmounting

Ocular GFP expression in rats and dogs was monitored at weekly intervals by fluorescence fundus photography using a Canon UVI retinal camera connected to a digital imaging system (Lhedioph Win Software, Lheritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France).

The preparation of retina flatmounts was performed identically in all animals on 4% paraformaldehyde-fixed enucleated eyes as described earlier.³⁶

Fixed flatmounts were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) and snap frozen in liquid nitrogen. Cryosections were cut (10 μ m) and observed using epifluorescence microscopy (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

Histology and Immunocytochemistry

For histological examinations, retina cryosections were stained using a standard hematoxylin, eosin, safran (HES) staining protocol. HES sections were viewed with bright-light microscopy (Nikon, Champigny sur Marne, France).

For immunocytochemical analysis, retina cryosections were thawed and rehydrated with PBS (BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgium). The sections were blocked by incubation for one hour at room temperature in blocking buffer (0.4% PBS/TritonX-100, 6,5% bovine serum albumin), washed in PBT (0.2% PBS/TritonX-100, 5% BSA) and incubated overnight at 4 °C with mouse monoclonal anti-RPE65 antibodies (Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:250 in PBT.

After washing, the sections were incubated overnight at 4°C with goat anti-mouse antibodies conjugated with Alexa fluor 546nm (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR) diluted at 1:250 in PBT. After washing with PBS, nuclei were stained by incubation with DAPI (Sigma Aldrich, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) diluted in PBS at 4µg/mL for 20 min at room temperature, and mounted with an antifade medium (Calbiochem, San Diego, CA). The immunolabeled sections were examined by epifluorescence microscopy (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

Detection of GFP-specific antibodies by Western blot

Following electrophoresis of 200ng of recombinant GFP (Millipore, Billerica, MA) per lane, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond, Amersham, Les Ulis, France) blocked with a solution of PBS supplemented with 5% non-fat dry milk, 1% NP-40 and 0.1% Tween 20, overnight at 4°C. Membranes were then immunoblotted for two hours with the sera of injected animals diluted at 1:100 and next incubated with peroxidase-labeled goat anti-dog IgG (1:15000, Serotec, Oxford, UK) for 45 min. Rabbit anti-GFP antibodies (Millipore, Temecula, CA) served as a positive control. All membranes were visualized using ECL and exposure to ECL Hyperfilm.

Detection of AAV9-specific antibodies

AAV9-specific antibodies in the serum of injected and uninjected dogs were detected according to a recently described procedure.³⁷ Briefly, serum samples were heat-inactivated at 56°C for 35 min. Recombinant ssAAV2/9.CMV.LacZ (4×10^3 viral genomes/ well) was diluted in serum-free Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Eurobio, Les Ulis, France) and incubated with serial dilutions (initial dilution, 1:10) of heat-inactivated serum samples on DMEM for 20 minutes at 37°C. Subsequently, serum-vector mixture was added to 96-well plates containing 2×10^5 HeLa T cells/ well that had been infected two hours earlier with wild-type HAAdV5 (8 viral particles/cell). After an incubation of 24 h at 37°C and 5% CO₂, cells were fixed with 0.5% glutaraldehyde and developed with X-Gal solution (Promega, Madison, WI). The antibody titer was reported as the highest serum dilution that inhibited ssAAV2/9.CMV.LacZ transduction (β -galactosidase expression) by 100%.

Acknowledgements

We would like to thank the Vector Core (www.vectors.nantes.inserm.fr) at the University Hospital of Nantes. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the INSERM, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, Sanchez-Pernaute R, Pivrotto P, Bringas J *et al.* Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC. *Mol Ther* 2006; **14**: 564-70.
2. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, Arruda VR, Tillson DM, Hathcock J *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 2009; **113**: 797-806.
3. Stieger K, Mendes-Madeira A, Meur GL, Weber M, Deschamps JY, Nivard D *et al.* Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther* 2007; **14**: 1668-73.
4. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 2008; **16**: 1073-80.
5. Yue Y, Ghosh A, Long C, Bostick B, Smith BF, Kornegay JN *et al.* A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol Ther* 2008; **16**: 1944-52.

6. Tarantal AF, Lee CC. Long-term luciferase expression monitored by bioluminescence imaging after adeno-associated virus-mediated fetal gene delivery in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hum Gene Ther* 2010; **21**: 143-8.
7. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, McTiernan CF, Kay MA *et al*. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 2006; **14**: 45-53.
8. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM *et al*. Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 2009; **17**: 1187-96.
9. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 59-65.
10. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM *et al*. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 271-4.
11. Cearley CN, Wolfe JH. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol Ther* 2006; **13**: 528-37.

12. Glatzel M, Flechsig E, Navarro B, Klein MA, Paterna JC, Bueler H *et al.* Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 442-7.
13. Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ *et al.* Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2010; **2**: 35ra42.
14. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 2008; **16**: 1648-56.
15. Cunha-Vaz J. The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol* 1979; **23**: 279-96.
16. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008; **57**: 178-201.
17. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; **368**: 1795-809.
18. Rajappa M, Goyal A, Kaur J. Inherited metabolic disorders involving the eye: a clinico-biochemical perspective. *Eye (Lond)* 2010; **24**: 507-18.
19. Parrish CR. Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010.

20. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 2005; **5**: 285-97.
21. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TG, Bergen AA. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res* 2010; **29**: 1-18.
22. Cairns JE. Normal development of the hyaloid and retinal vessels in the rat. *Br J Ophthalmol* 1959; **43**: 385-93.
23. Cunha-Vaz JG, Shakib M, Ashton N. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *Br J Ophthalmol* 1966; **50**: 441-53.
24. Flower RW, McLeod DS, Luty GA, Goldberg B, Wajer SD. Postnatal retinal vascular development of the puppy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; **26**: 957-68.
25. Nakaizumi Y. The Ultrastructure of Bruch's Membrane. Ii. Eyes with a Tapetum. *Arch Ophthalmol* 1964; **72**: 388-94.
26. Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 12932-7.

27. Bostick B, Ghosh A, Yue Y, Long C, Duan D. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther* 2007; **14**: 1605-9.
28. Hirabayashi Y, Fujimori O, Shimizu S. Bruch's membrane of the brachymorphic mouse. *Med Electron Microsc* 2003; **36**: 139-46.
29. Braekevelt CR, Hollenberg MJ. Development of the retinal pigment epithelium, choriocapillaris and Bruch's membrane in the albino rat. *Exp Eye Res* 1970; **9**: 124-31.
30. Greiner JV, Weidman TA. Comparative histogenesis of Bruch's membrane (complexus basalis). *Exp Eye Res* 1991; **53**: 47-54.
31. Shimomura Y, Hirata A, Ishikawa S, Okinami S. Changes in choriocapillaris fenestration of rat eyes after intravitreal bevacizumab injection. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; **247**: 1089-94.
32. Day MJ. Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol* 2007; **137** **Suppl 1**: S10-5.
33. McCarthy SA, Bach FH. The cellular mechanism of maintenance of neonatally induced tolerance to H-2 class I antigens. *J Immunol* 1983; **131**: 1676-82.

34. Weinstein DA, Correia CE, Conlon T, Specht A, Versteegen J, Onclin-Versteegen K *et al.* Aav-Mediated Correction of a Canine Model of Glycogen Storage Disease Type Ia. *Hum Gene Ther* 2010.
35. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X *et al.* Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; **76**: 791-801.
36. Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D *et al.* Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* 2003; **7**: 774-81.
37. Calcedo R, Vandenberghe LH, Gao G, Lin J, Wilson JM. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* 2009; **199**: 381-90.

Figure Legends

Figure 1. Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn rats results in GFP expression in the retina

Live fluorescence fundus photography of rats R3, R7 and R11, injected intravenously at post natal day 1 (PN1) respectively with **(a, b)** scAAV2/5.gfp, **(c, d)** scAAV2/8.gfp or **(e, f)** scAAV2/9 and observed at **(a, c, e)** three weeks or **(b, d, f)** 10 weeks post-injection.

Figure 2. Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn rats results in GFP expression in the retinal pigmented epithelium (RPE) cells

(a-c) Retina flatmounts and **(d-f)** sections of rat R11 injected intravenously at PN1 with scAAV2/9.gfp. **(g-i)** Retina sections of the uninjected control rat R15. **(a, b)** Choroid/RPE flatmount displayed fluorescent RPE cells. **(c)** Neuroretina flatmount did not display any fluorescent cells. **(d, g)** Retina sections were stained with hematoxylin-eosin-safran (HES) or **(e, f, h, i)** observed directly by fluorescence microscopy (green, GFP; blue, DAPI). Bar = 100µm. gcl, ganglion cell layer; inl, inner nuclear layer; onl, outer nuclear layer; rpe, retinal pigmented epithelium.

Figure 3. Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn and adult dogs results in GFP expression in the posterior segment of the eye

Live fluorescence fundus photography at three month post-vector administration. **(a)** Uninjected control dog D5 and **(b)** dog D1 from the same litter injected intravenously at PN1 with scAAV2/9.gfp. **(c)** Uninjected control dog D6 and **(d)** dog D4 from the same litter injected intravenously with scAAV2/9.gfp at PN60. **(e)** Detection of GFP-specific antibodies by Western blot: following electrophoresis of 200ng of GFP per lane, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and immunoblotted with the serum of animals taken before and two months after vector injection (inj). GFP-specific antibody (Ab). A one-minute exposure to film is shown.

Figure 4. Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in newborn dogs results in GFP expression in the RPE cells and in the tapetum lucidum

(a-i) Retina sections of dog D1 injected intravenously at PN1 with scAAV2/9.gfp. **(j-l)** Retina sections of uninjected control dog D5. Retina sections were sampled **(a-c, g-i, j-l)** inside the tapetal area and **(d-f)** outside the tapetal area. **(a, d, j)** Retina sections were stained with HES or **(b, c, e, f, k, l)** observed directly by fluorescence microscopy (green, GFP; blue, DAPI). **(g, h, i)** Retina sections immunolabeled for RPE65 displayed colocalization with GFP fluorescence (green, GFP; red, RPE65; blue, DAPI). Bar = 100µm. gcl, ganglion cell layer; inl, inner nuclear layer; onl, outer nuclear layer; rpe, retinal pigmented epithelium; tp, tapetum lucidum; ch, choroid; sc, sclera.

Figure 5. Intravenous injection of scAAV2/9.gfp vector in adult dogs results in GFP expression exclusively in the tapetum lucidum

(a-i) Retina sections of dog D4 injected intravenously at PN60 with scAAV2/9.gfp. Retina sections were sampled **(a-c, g-i)** inside the tapetal area and **(d-f)** outside the tapetal area. **(a, d)** Retina sections were stained with HES or **(b, c, e, f)** observed directly by fluorescence microscopy (green, GFP; blue, DAPI). **(g, h, i)** Retina sections immunolabeled for RPE65 do not display colocalization with GFP fluorescence (green, GFP; red, RPE65; blue, DAPI). Bar = 100µm. gcl, ganglion cell layer; inl, inner nuclear layer; onl, outer nuclear layer; rpe, retinal pigmented epithelium; tp, tapetum lucidum; sc, sclera.

Table 1. List of rats and rAAV serotypes injected

Animal	Age of injection (days)	scAAV serotype	Dose (vg/kg)	GFP signal intensity (fundus photography)	Tropism (histological observation)
R1	1	AAV2/1	10 ¹²	-	nd
R2	1	AAV2/1	10 ¹²	-	nd
R3	1	AAV2/5	10 ¹²	+	RPE
R4	1	AAV2/5	10 ¹²	+	RPE
R5	1	AAV2/6	10 ¹²	-	nd
R6	1	AAV2/6	10 ¹²	-	nd
R7	1	AAV2/8	10 ¹²	+	RPE
R8	1	AAV2/8	10 ¹²	+	RPE
R9	90	AAV2/8	10 ¹²	-	nd
R10	90	AAV2/8	10 ¹²	-	nd
R11	1	AAV2/9	10 ¹²	+++	RPE
R12	1	AAV2/9	10 ¹²	+++	RPE
R13	90	AAV2/9	10 ¹²	-	nd
R14	90	AAV2/9	10 ¹²	-	nd
R15	Uninjected			-	-

Abbreviations: GFP, green fluorescent protein; kg, kilogram; nd, not done; R, rat; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RPE, retinal pigmented epithelium; sc, self-complementary; vg, vector genome.

Table 2. List of dogs intravenously injected with 10^{12} vg/ kg of scAAV2/9.gfp

Animal	Age of injection (days)	Immunosuppressive regimen	GFP signal intensity (fundus phtography)	Tropism (histological observation)	Anti-GFP Ab		Neutralizing anti-AAV9 Ab	
					Before inj	After inj	Before inj	After inj
D1	1	None	+	RPE+Tapetum	na	-	na	1/100
D2	1	None	+	RPE+Tapetum	na	-	na	1/100
D3	60	CyA+MMF (30 days)	+ (45 days)	nd	-	+	-	1/1000
D4	60	CyA+MMF	+	Tapetum	-	-	-	1/50
D5	Uninjected		-	-	-	-	-	-
D6	Uninjected		-	-	-	-	-	-

Abbreviations: Ab, antibodies; AAV, adeno-associated virus; D, dog; CyA, cyclosporine A; GFP, green fluorescent protein; kg, kilogram; MMF, mycophenolate mofetil; na, not available; nd, not done; RPE, retinal pigment epithelium; sc, self-complementary; vg, vector genome.

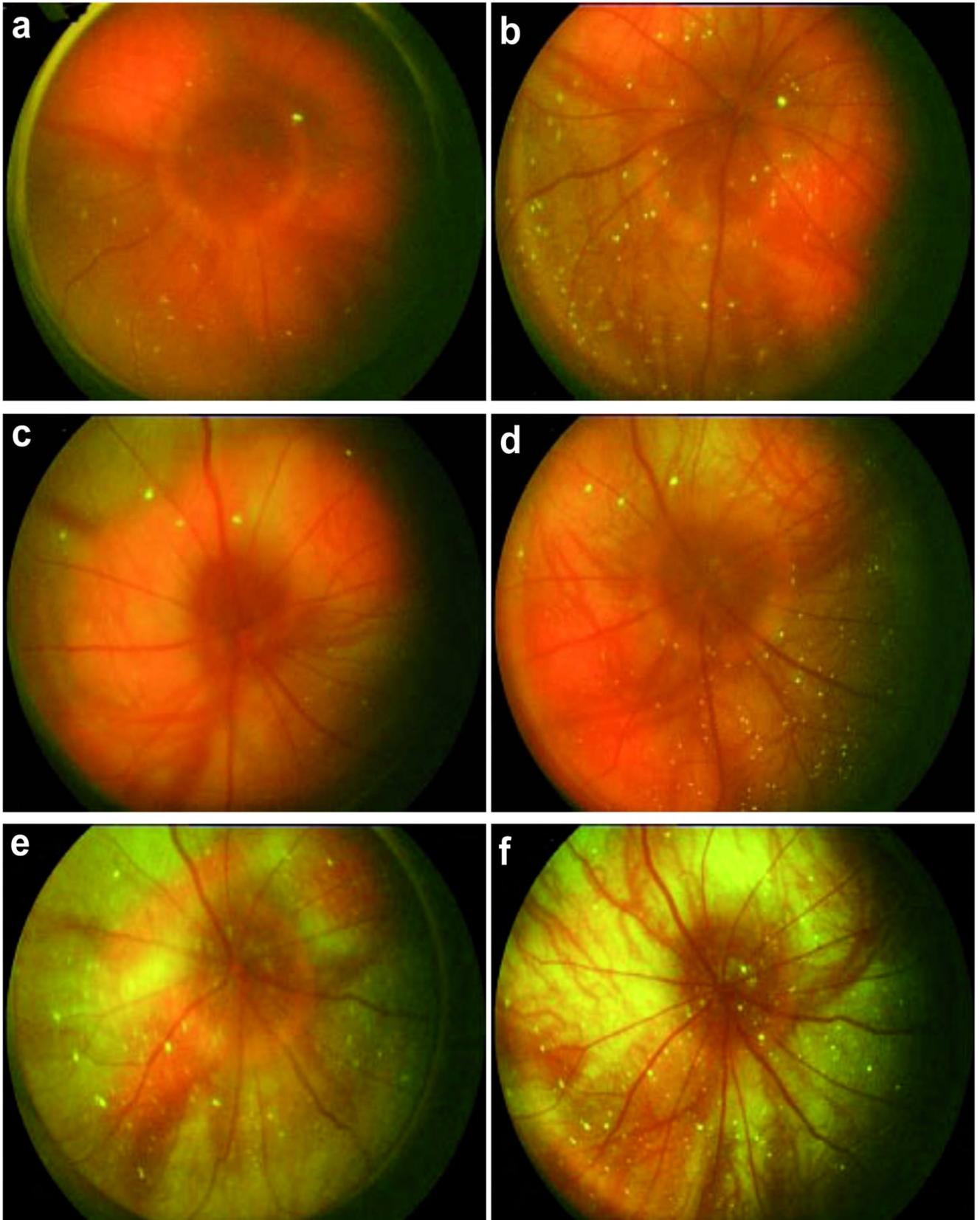


Figure 1

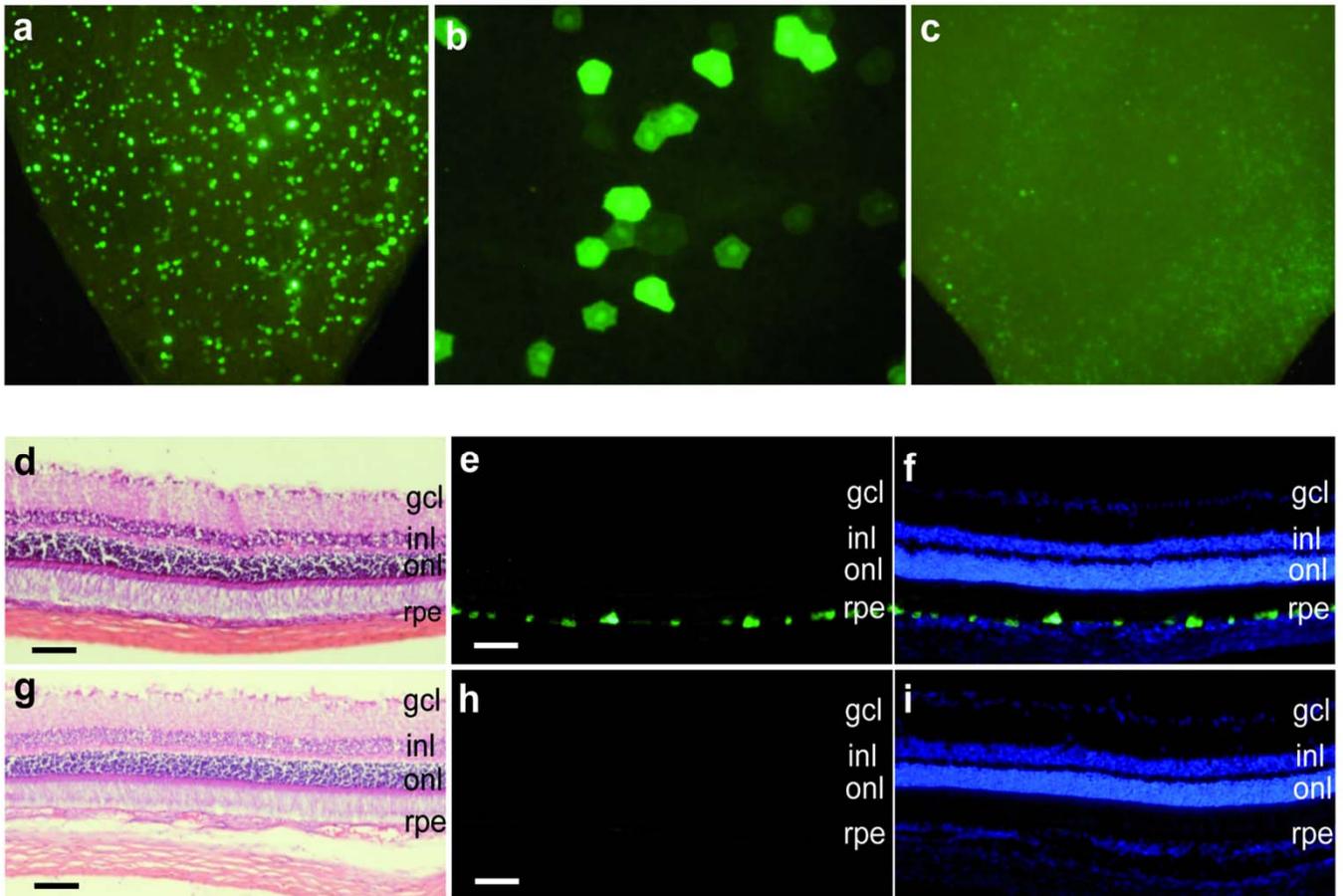


Figure 2

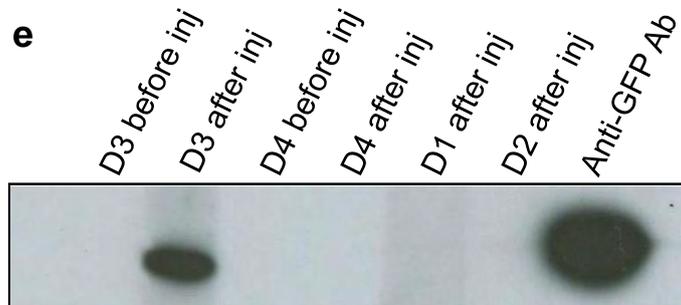
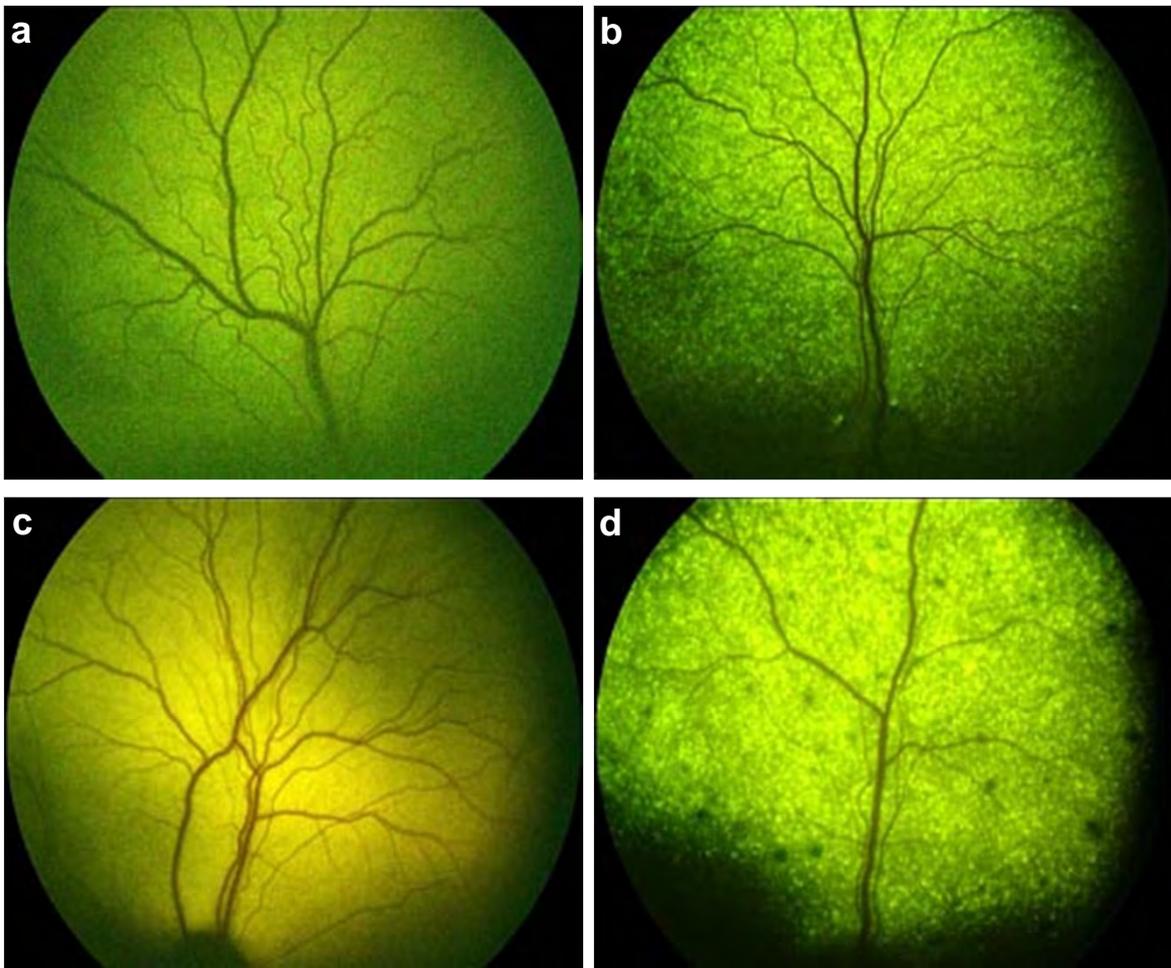


Figure 3

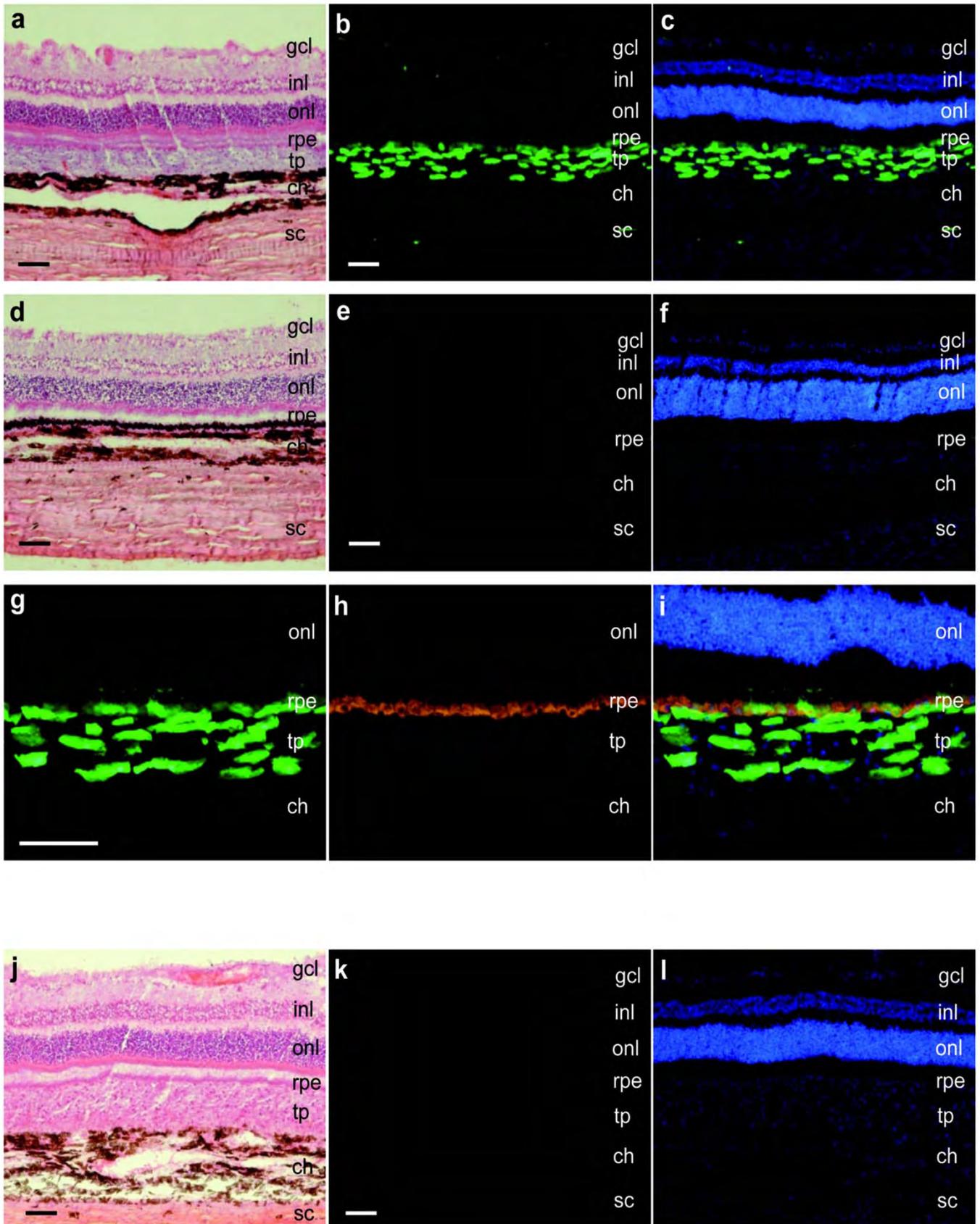


Figure 4

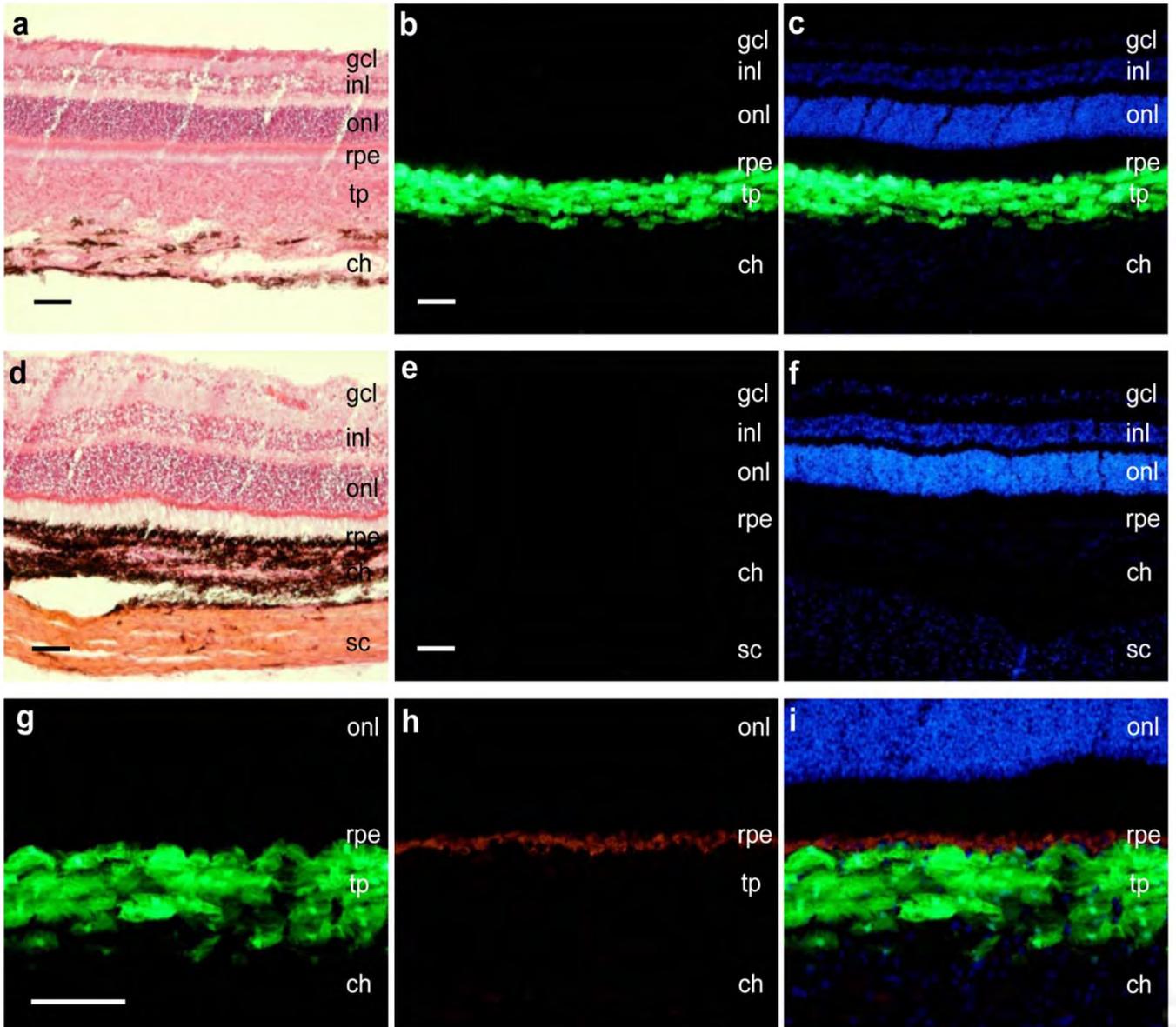


Figure 5

1.1 Résultats et Discussion

1.1.1 Introduction

Au cours de la dernière décennie, la thérapie génique s'est illustrée comme une approche médicale pertinente et réaliste pour le traitement des maladies génétiques, telles que les immunodéficiences congénitales (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Récemment, plusieurs essais cliniques ont aussi évalué avec succès la thérapie génique pour le traitement des maladies neurodégénératives, qui affectent la rétine ou le cerveau (Bainbridge et al., 2008; Christine et al., 2009; Eberling et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008a; Marks et al., 2008). Dans ces différents protocoles cliniques de transfert de gène, un vecteur AAVr simple brin (ssAAV) a été injecté localement, soit dans l'espace sous-rétinien de l'œil, soit dans le cerveau. Or, l'administration locale de ces vecteurs ssAAV ne permet de transduire qu'un faible volume de ces organes, bien que la totalité de ceux-ci soit souvent affecté dans ces pathologies, et nécessiterait de recevoir le transgène thérapeutique.

En conséquence, différents groupes de chercheurs ont tenté d'améliorer l'étendue et l'efficacité du transfert de gène, en multipliant le nombre d'injections du vecteur thérapeutique dans ces organes.

Tan et coll. ont montré qu'une seule injection sous-rétinienne du vecteur ssAAV2 chez la souris permet la transduction d'environ 20% de la rétine, tandis que deux injections sous-rétiennes permettent de couvrir 40% de la rétine (Tan et al., 2009). Cependant, cette approche augmente de façon significative les risques de lésions et de traumatismes associés au geste chirurgical. De ce fait, cette stratégie semble difficilement applicable en clinique chez les patients atteints de RP dont la rétine est déjà largement fragilisée.

De façon similaire, Sondhi et coll., puis Hackett et coll., ont montré qu'il est possible de transduire une grande partie des 2 hémisphères cérébraux chez le rat et le primate, à l'aide d'un vecteur ssAAV2 codant pour l'enzyme TPP1, en réalisant 12 injections intracérébrales au niveau des cortex frontaux, pariétaux et occipitaux (Hackett et al., 2005; Sondhi et al., 2005). Cependant, l'application de ce protocole d'administration chez 10 enfants atteints de la maladie de Batten, et déficients pour l'enzyme TPP1, a induit presque systématiquement de nombreux effets délétères suite à l'administration, tels que des épisodes épileptiques et des détresses respiratoires (Worgall et al., 2008).

Ces études illustrent les difficultés auxquelles sont confrontés les chercheurs pour le développement de protocoles efficaces de thérapie génique. Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'il est question de corriger complètement le phénotype pathologique dans les maladies neurodégénératives, qui affectent simultanément plusieurs organes dont la rétine et le cerveau, telles que la maladie de Batten et les mucopolysaccharidoses de types 1, 2, 3, et 4 (MPS I, MPS II, MPS III et MPS IV). Pour cela, il faudrait apporter efficacement le transgène thérapeutique dans tous les organes affectés, sans induire d'effets délétères ou l'induction d'une réponse immune contre le vecteur AAVr ou le transgène qui limiterait l'expression à long terme du transgène *in vivo*.

Récemment, le groupe du Dr Brian K Kaspar a montré récemment que l'administration néonatale et intraveineuse du vecteur double brin scAAV2/9 chez la souris et le primate, aboutissait à la transduction extensive du SNC, malgré la présence de la barrière hémato-méningée (BHM) qui restreint le passage de la plupart des molécules et cellules sanguines (Foust et al., 2009; Foust et al., 2008; Foust et al., 2010). L'administration intraveineuse de 4.10^{11} vg du vecteur scAAV2/9 chez la souris nouveau-née permet l'expression forte et stable du gène rapporteur GFP dans les muscles squelettiques et cardiaques, mais aussi dans l'ensemble de la moelle épinière et du cortex cérébral, ainsi que dans le cervelet et l'hippocampe bien que la BHM est considérée comme fonctionnelle à la naissance (Foust et al., 2009). Les auteurs de cette étude ont aussi montré que le tropisme du vecteur scAAV2/9 pour le système nerveux central (SNC), est conditionné par l'âge d'administration du vecteur. Ainsi, l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 aboutit chez la souris nouveau-née à la transduction des cellules neuronales et gliales, tandis que chez la souris adulte l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 aboutit à la transduction des cellules gliales. L'utilisation dans ces études d'un vecteur scAAV2/9 double brin, a probablement contribué à une forte expression du vecteur dans le système nerveux central, en permettant de s'affranchir de l'étape cellulaire limitante de conversion du génome des vecteurs ssAAV simple brin vers leur forme double brin (McCarty, 2008).

Or, la barrière hémato-rétinienne (BHR) qui isole et protège la rétine des facteurs potentiellement nocifs circulant dans le sang, présente de nombreuses similarités d'un point de vue anatomique et fonctionnel avec la BHM qui isole et protège le cerveau de la circulation sanguine. La BHM est caractérisée par la structure de ces vaisseaux sanguins qui sont non-fenêtrés, et dont les cellules endothéliales sont solidarisées par des jonctions serrées (Zlokovic, 2008). De plus les capillaires sanguins de la BHM sont associés à une membrane basale, des péricytes et des astrocytes. Dans la rétine, la BHR est formée par les vaisseaux intra-rétiniens et les cellules de l'EPR. Les vaisseaux sanguins intra-rétiniens sont organisés de façon identique aux vaisseaux sanguins de la BHM, et disposent des mêmes propriétés de perméabilité aux cellules, aux macromolécules et aux

solutés présents dans le sang (Cunha-Vaz, 1979; Steuer et al., 2005). Les cellules de l'EPR forment, quant à elles, une barrière épithéliale qui isole la neurorétine, de l'espace choroïdien et en particulier des vaisseaux sanguins très perméables du choriocapillaris (Bellhorn, 1981; Peyman et al., 1971; Pino and Essner, 1981; Pino et al., 1982; Shimomura et al., 2009). Les cellules de l'EPR sont solidarisées par des jonctions serrées qui forment une *zonula occludens* continue dans toute la couche cellulaire de l'EPR.

En outre, il est intéressant de noter que les vecteurs AAVr de sérotype 9 ont un fort tropisme pour de nombreux types cellulaires de la rétine, dont les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, lorsqu'ils sont administrés localement par voie sous-rétinienne (Allocca et al., 2007; Lei et al., 2009).

Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de comparer le tropisme oculaire de différents sérotypes de scAAV, et en particulier celui du vecteur scAAV2/9, après administration intraveineuse chez le nouveau-né et l'adulte. L'objectif principal de cette étude est de déterminer si ces vecteurs sont capables de franchir la barrière hémato-rétinienne (BHR) et de transduire la rétine, de la même façon que ce qui a été décrit par le Dr Kaspar pour la BHM et l'encéphale (Foust et al., 2009).

Dans un premier temps nous avons évalué chez le rat nouveau-né et adulte, le tropisme oculaire des vecteurs scAA2/1, scAAV2/5, scAAV2/6, scAA2/8 et scAAV2/9 après administration intraveineuse à la dose de 1.10^{12} vecteur génome par Kg (vg/Kg). Dans ce but, nous avons construit ces différents vecteurs pour qu'ils codent pour le transgène eGFP sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV. Nous avons administré ces vecteurs *via* la veine temporale chez des rats âgés de 1 jour (PN1), et *via* la veine de la queue chez des rats adultes à PN90. Le profil d'expression du gène rapporteur eGFP dans l'œil a été déterminé *in vivo* par photographie du fond d'œil en fluorescence, et sur des coupes transversales de rétine par microscopie à fluorescence.

Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné le vecteur scAAVr ayant montré la meilleure efficacité de transfert de gène dans la rétine chez le rat, puis nous avons évalué le tropisme oculaire de ce vecteur chez le chien et le chat à PN1 et à PN60. Le chien et le chat sont des modèles animaux plus proches de l'homme que le rat, du point de vue anatomique et physiologique, mais aussi pour ce qui est du système immunitaire, et du développement oculaire. Dans ce but, nous avons administré le vecteur le plus performant à la dose de 1.10^{12} vg/Kg *via* la veine jugulaire chez le chien et le chat à PN1 ou PN60. De la même façon, l'expression oculaire de ce vecteur a été déterminée par examen *in vivo* du fond d'œil par fluorescence, et sur des coupes de rétine par microscopie à fluorescence.

1.2 Résultats et Discussion

1.2.1 Évaluation du tropisme oculaire des différents sérotypes de vecteur scAAV.CMV.eGFP chez le rat nouveau-né, après administration intraveineuse

Résultats expérimentaux

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité des vecteurs scAAV de sérotypes 1, 5, 6, 8 et 9 à transduire le segment postérieur de l'œil, chez le rat nouveau-né, après administration intraveineuse. Le segment postérieur de l'œil situé à l'arrière du cristallin (**figure 1**). Le segment postérieur est formé par la superposition de la neurorétine, de l'EPR, de la choroïde et de la sclère.

Dans ce but, nous avons administré par voie intraveineuse 1.10^{12} vg/Kg de chacun de ces vecteurs, au niveau de la veine temporale chez le rat à PN1. Chaque vecteur a été injecté chez 2 rats nouveau-nés, sauf pour le vecteur scAAV2/9.gfp qui a été injecté chez 7 rats nouveau-nés. Nous avons ensuite évalué le profil d'expression oculaire de ces vecteurs par photographie du fond d'œil en fluorescence, qui permet de visualiser l'expression du gène rapporteur eGFP *in vivo* et de façon répétée et non invasive.

L'observation en fluorescence du fond d'œil des rats injectés à PN1 avec les vecteurs scAAV2/1.gfp (n=2) ou scAAV2/6.gfp (n=2), ne révèle pas l'expression du gène rapporteur eGFP dans le segment postérieur de l'œil, que ce soit à 3 ou 10 semaines post-injection (**figure S1**).

Un léger signal fluorescent très sporadique est détecté dans le segment postérieur des rats injectés avec les vecteurs scAAV2/5.gfp (n=2) ou scAAV2/8.gfp (n=2), à 3 semaines post-injection (**figures 1a et 1c**). Entre 3 et 10 semaines post-injection, l'expression de l'eGFP augmente en intensité, (**figures 1b et 1d**). Le profil d'expression de ces vecteurs est similaire dans l'œil droit et l'œil gauche de chaque rat (**figure S1**).

À l'inverse, un signal fluorescent relativement fort et homogène est détecté sur une très grande partie du segment postérieur des rats injectés avec le vecteur scAAV2/9.gfp (n=7) (**figures 1e et 1f**). Ce signal GFP fort a été observé chez tous les rats injectés à PN1, et ceci dans leurs 2 yeux (**figure S2**). L'intensité du signal fluorescent eGFP induite par l'administration du vecteur scAAV2/9 est de loin supérieure à celle induite par les autres vecteurs, que ce soit à 3 semaines post-injection (**figure 1e**) ou 10 semaines post-injection (**figure 1f**). Entre 3 et 10 semaines post-injection, le signal fluorescent eGFP augmente notablement en intensité.

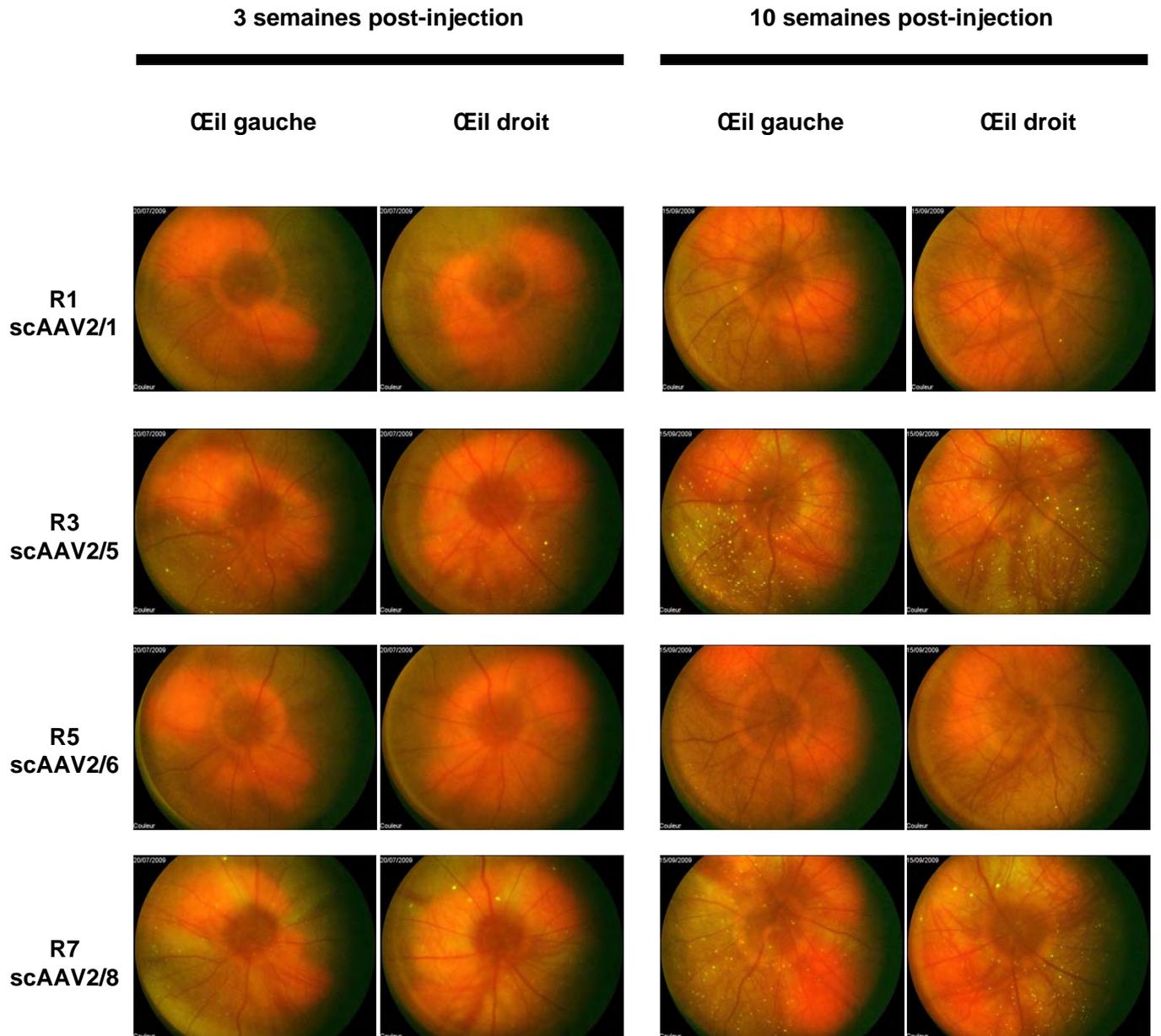


Figure S1. L'injection intraveineuse des vecteurs scAAV2/1.gfp, scAAV2/5.gfp, scAAV2/6.gfp et scAAV2/8.gfp chez le rat nouveau-né, n'aboutit pas à l'expression efficace de l'eGFP dans le segment postérieur de l'œil.

Photographie en fluorescence du fond d'œil *in vivo* des rats R1, R3, R5 et R7, injectés respectivement avec les vecteurs scAAV2/1.gfp, scAAV2/5.gfp, scAAV2/6.gfp, et scAAV2/8.gfp par voie intraveineuse à 1 jour après la naissance.

Le fond d'œil de ces rats a été photographié en fluorescence à 3 semaines et 10 semaines post-injection.

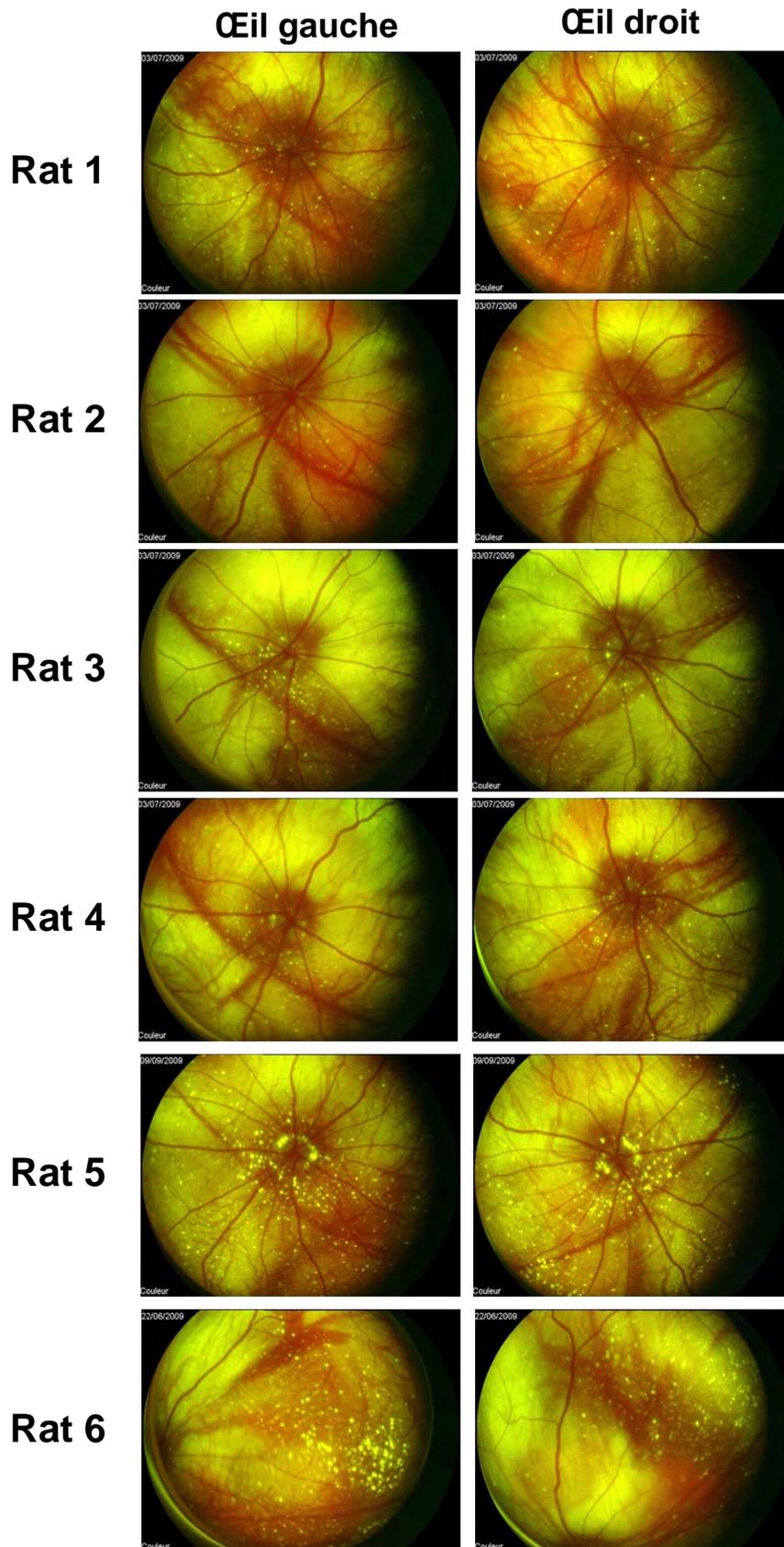


Figure S2. L'injection intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp chez le rat nouveau-né aboutit de façon reproductible à l'expression efficace de l'eGFP dans le segment postérieur, et dans les deux yeux simultanément.

Photographie en fluorescence du fond d'œil *in vivo* chez 6 rats injectés avec le vecteur scAAV2/9.gfp par voie intraveineuse à 1 jour après la naissance.

Le fond d'œil de ces rats a été photographié en fluorescence dans leur œil droit et gauche à 12 semaines post-injection.

A 3 mois post-injection, les yeux des rats injectés à PN1 avec le vecteur scAAV2/9.gfp ont été prélevés, et traité de 2 façon différentes après fixation au PFA (1) soit la neurorétine est séparée de l'EPR et de la choroïde pour réaliser des photographie de montage à plat de rétine, (2) soit coupé au cryostat pour réaliser des coupes congelées transversales du segment postérieur (rétine-choroïde-sclère) (**figures 2a-c**).

L'observation des montages à plat au microscope à fluorescence ne révèle l'expression sporadique mais forte de l'eGFP dans les cellules de l'EPR sur la totalité de la surface de la rétine (**figure 2a et 2b**), mais pas dans la neurorétine (**figure 2c**). L'expression de l'eGFP dans les cellules de l'EPR est caractérisée par la forme hexagonale des cellules de l'EPR et donc du signal fluorescent eGFP (**figure 2b**).

L'analyse des coupes transversales de rétine a été réalisée après marquage de l'ADN nucléaire au DAPI (bleu). Le transgène eGFP est exprimée dans les cellules de l'EPR, mais pas dans la neurorétine, ni dans la choroïde (**figure 2d-f**). On estime entre 10 et 40% la proportion de cellules de l'EPR exprimant l'eGFP.

En parallèle, nous avons injecté des rats contrôles à PN1 avec une solution tampon (PBS) ne contenant pas le vecteur scAAV2/9. L'analyse de leur fond d'œil et de coupes congelées de leurs rétines, ne révèle pas de signal fluorescent eGFP dans le segment postérieur de leurs yeux (**figure 2g-i**).

Discussion des résultats expérimentaux

Ces résultats montrent que le vecteur scAAV2/9 administré chez le rat à PN1 dans la circulation sanguine permet la transduction bilatérale de la rétine, et plus précisément des cellules de l'EPR, contrairement aux vecteurs scAAV2/1, scAAV2/5, scAAV2/6, et scAAV2/8. L'efficacité de transduction des cellules de l'EPR induite par ce protocole est relativement faible, car moins d'un tiers des cellules de l'EPR exprime le transgène, mais permet de couvrir la presque totalité de rétine, contrairement à ce qui est obtenue traditionnellement après injection sous-rétinien. Néanmoins, aucun de ces vecteurs ne permet la transduction de la neurorétine.

L'absence de cellules transduites dans la neurorétine pourrait s'expliquer par l'immaturation de la vascularisation intra-rétinienne qui couvre moins de 10% de la surface de la rétine à la naissance chez le rat (Cairns, 1959), à l'inverse de la vascularisation de la choroïde qui est mature et très bien développée à la naissance (Braekevelt and Hollenberg, 1970; Cairns, 1959). La vascularisation intra-rétinienne se développe essentiellement après la naissance chez la souris, le rat ou le chien, à l'inverse du primate ou de l'humain dont les vascularisations intra-rétiniennes et choroïdiennes sont

complètement développées à la naissance (Cairns, 1959; Cunha-Vaz, 1966; Flower et al., 1985 ; Fruttiger, 2007 ; Gariano and Gardner, 2005; Provis, 2001).

De ce fait, nos résultats suggèrent que la transduction des cellules de l'EPR est induite par l'extravasation des vecteurs scAAV2/5, 2/8 et 2/9, à partir des vaisseaux choroïdiens, et plus probablement du choriocapillaris qui est très perméable et adjacent aux cellules de l'EPR (Pino and Essner, 1981; Pino et al., 1982; Shimomura et al., 2009). En outre, l'absence de transduction de la neurorétine indique l'incapacité de ces vecteurs à franchir la barrière que constitue l'EPR, pour entrer dans la neurorétine.

La transduction de l'EPR observée suite à l'administration intraveineuse du vecteur de sérotype scAAV2/9 est bien plus forte qu'après administration des autres sérotypes évalués. Cette différence est probablement liée à propriétés biologiques individuelles de chacun de ces vecteurs, et en particuliers aux propriétés biologiques spécifiques du sérotype 9 de l'AAV.

En effet, Zincarelli et coll. ont montré qu'après son administration dans la veine de la queue, le vecteur ssAAV2/9 persiste dans la circulation sanguine beaucoup plus longtemps que les vecteurs ssAAV2/1, 2/5 et 2/8, chez la souris adulte (Zincarelli et al., 2008). À 48 heures post-injection, la concentration sanguine du vecteur ssAAV2/9 était 100 fois plus grande que celles des vecteurs ssAAV2/1 et ssAAV2/6, et 10 fois plus grande que celle du vecteur ssAAV2/8. La vitesse d'élimination plus faible du vecteur ssAAV2/9 par rapport aux autres vecteurs évalués, peut avoir pour cause une stabilité plus importantes des particules dans la circulation sanguine, ou encore une vitesse de capture moins importante du vecteur circulant par les organes fortement irrigués tels que le foie.

On peut donc supposer que la plus grande disponibilité des vecteurs AAV9 circulant après administration intraveineuse, favorise une meilleure transduction des organes distants et très irrigués comme l'œil.

D'autre part, ces différents sérotypes de vecteur AAVr sont dépendants de différents récepteurs et corécepteurs cellulaires, pour entrer et transduire les cellules (**figure 15**) (Parrish, 2010).

Les vecteurs de sérotypes AAV2/1, 2/5, 2/8 et 2/9 sont capables d'entrer et de transduire plus ou moins efficacement les cellules de l'EPR, lorsqu'ils sont injectés dans l'espace sous-rétinien au niveau du pôle apical des cellules de l'EPR. A l'inverse, dans notre étude, les vecteurs AAVr sont administrés par voie intraveineuse, ce qui induit leur extravasation des choriocapillaris et leur contact avec les cellules de l'EPR au niveau du pôle basal des cellules de l'EPR.

Or les cellules de l'EPR sont des cellules très polarisées (**figure S3**) (Sonoda et al., 2009). L'organisation fonctionnelle des cellules de l'EPR repose sur l'expression de récepteurs, de molécules d'adhésion et de canaux ioniques, de façon exclusive sur certains domaines cellulaires : surface apicale, basale, ou baso-latérale (Gundersen et al., 1991; Gundersen et al., 1993; Philp et al., 2003; Quinn and Miller, 1992 ; Rizzolo, 2007). De ce fait, on peut supposer que les récepteurs cellulaires permettant l'entrée cellulaire de ces différents sérotypes d'AAVr au niveau du pôle apical, ne sont pas nécessairement présents au niveau du pôle basal des cellules de l'EPR. Ceci pourrait expliquer en partie l'absence de transduction de l'EPR par les vecteurs scAAV2/1 et 2/6.

Les vecteurs AAVr de sérotypes 8 et 9 ont été décrits comme utilisant le récepteur de la lamine 37/67-KDa (67LR) pour entrer dans les cellules (Gao et al., 2004; Gao et al., 2002) (**figure 15**). Or, plusieurs études réalisées chez la souris nouveau-née, ont montré que le récepteur 67LR est exprimé dans la rétine de façon abondante, au niveau des cellules de l'EPR et de la choroïde. (McKenna et al., 2001; Stitt et al., 1998). Ceci pourrait expliquer la meilleure efficacité de transduction de l'EPR par le vecteur scAAV2/9 qui a été décrit comme interagissant avec le récepteur cellulaire 67R pour entrer dans les cellules (Gao et al., 2004) (**figure 15**).

La capacité du vecteur scAAV2/9.gfp à transduire plus efficacement les cellules de l'EPR, pourrait aussi être expliquée par la capacité des vecteurs ssAAV2/9 et scAAV2/9 à franchir les barrières endothéliales et conjonctives, afin de sortir ou de rentrer dans la circulation sanguine. Ceci a été montré dans plusieurs études réalisées chez, la souris, le chien ou encore le primate. Bostick et coll. ont montré, chez la souris nouveau-née, que l'administration intraveineuse d'un vecteur ssAAV2/9, permet une transduction forte et stable de nombreux organes dont les muscles squelettiques et les poumons (Bostick et al., 2007; Zincarelli et al., 2008). Ceci suggère que le vecteur ssAAV2/9 a la capacité de franchir relativement facilement la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins, pour transduire ces différents organes. De plus, Inagaki et coll. ont montré que l'administration des vecteurs ssAAV2/8 et ssAAV2/9 par voie intra-péritonéale ou sous-cutanée chez la souris adulte, permet la transduction du foie (Inagaki et al., 2006). Les résultats de cette dernière étude suggèrent que les vecteurs ssAAV2/8 et 2/9 ont la capacité de franchir les barrières vasculaires, mais cette fois-ci pour entrer dans la circulation sanguine, puis pour transduire le foie. Yue et coll. ont montré que l'administration intraveineuse d'une forte dose de vecteur scAAV2/9 chez le chien nouveau-né (2.10^{14} vg/Kg), permet la transduction forte et stable d'un très grand nombre de muscles squelettiques dans le thorax et l'abdomen, les membres antérieures et postérieures, et la tête (Yue et al., 2008). Foust et coll. ont montré que le vecteur scAAV2/9 administré par voie intraveineuse chez le primate nouveau-né, a la capacité de franchir la barrière hémato-méningée pour transduire de façon forte et étendue le système nerveux central (Foust et al., 2010).

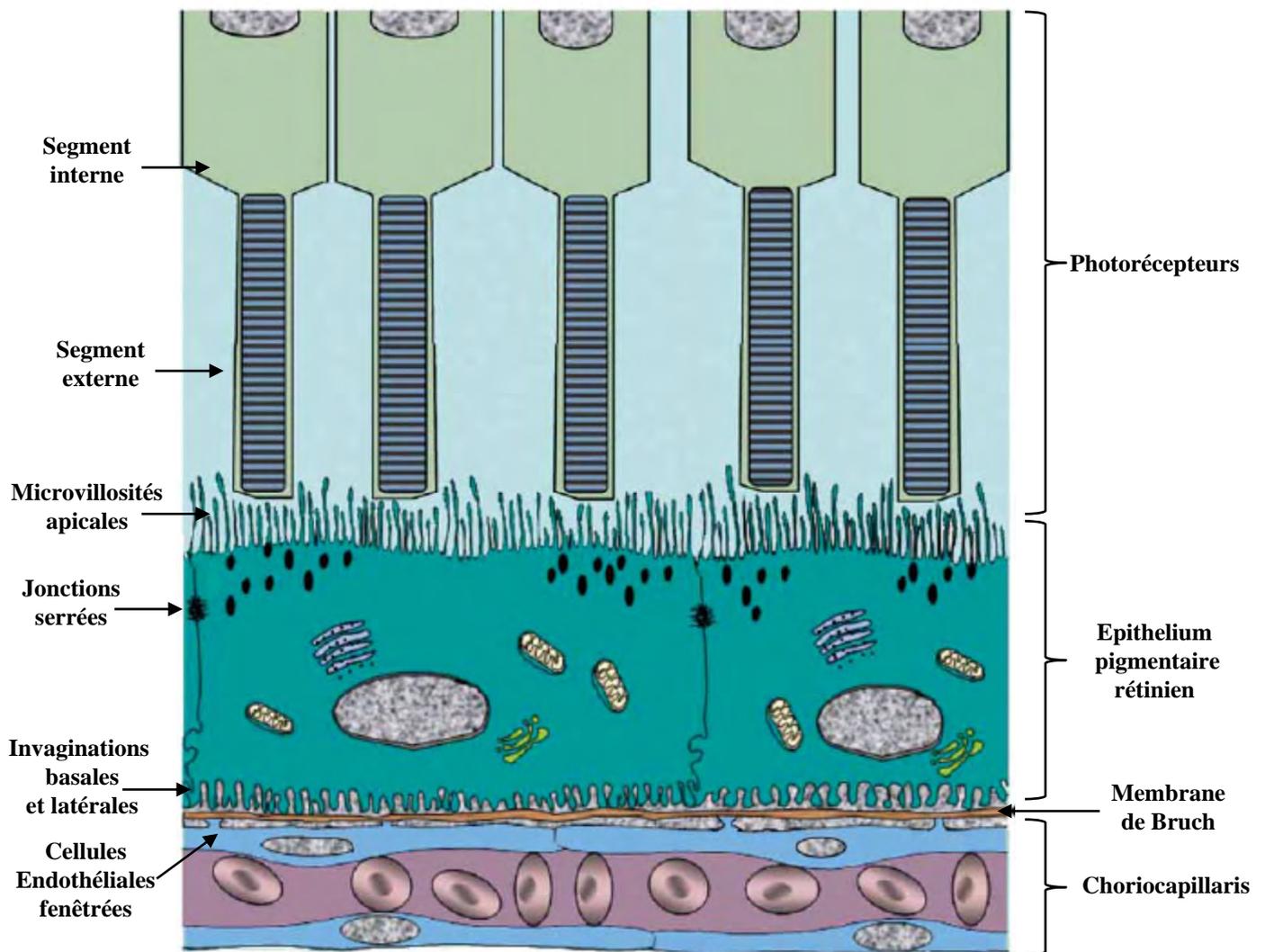


Figure S3. Schéma de la rétine et de la choroïde illustrant le caractère polarisé des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est situé entre la neurorétine et la choroïde. L'EPR est composé de cellules épithéliales polarisées et organisées en monocouche cellulaire. Les cellules de l'EPR sont organisées fonctionnellement en domaines cellulaires apicaux, basaux et latéraux spécialisés.

Au niveau du pôle apical, les cellules de l'EPR présentent de nombreuses microvillosités dans lesquelles sont enchâssés les segments externes des photorécepteurs. Ces interactions permettent la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, ainsi que le transport bidirectionnel de métabolites entre les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

Au niveau latéral, les cellules de l'EPR sont solidarisées par des jonctions serrées qui forment une *zonula occludens* continue sur toute la surface de l'EPR. Cette *zonula occludens* forme la barrière hémato-rétinienne externe.

Au niveau du pôle basal, les cellules de l'EPR présentent de nombreuses invaginations. L'EPR est associé à la membrane basale supérieure de la membrane de Bruch. Sous la membrane de Bruch, le choriocapillaris est un réseau dense de vaisseaux sanguins très perméables.

Illustrations issues de Sonoda 2009 Nature Protocols.

1.2.2 Évaluation du tropisme oculaire des sérotypes scAAV2/8 et scAAV2/9 chez le rat adulte, après administration intraveineuse

Résultats expérimentaux

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer si l'administration intraveineuse des vecteurs scAAV chez le rat adulte, permet la transduction des cellules de l'EPR de la même façon que chez le rat nouveau-né. Dans ce but, nous avons évalué le tropisme oculaire des vecteurs scAAV2/8.gfp et scAAV2/9.gfp chez le rat adulte, car ces 2 vecteurs apparaissent comme les vecteurs les plus efficaces pour transduire les cellules de l'EPR chez le rat nouveau-né après administration intraveineuse. Nous avons injecté ces vecteurs à la dose de 1.10^{12} vg/Kg, dans la veine de la queue de rats adultes à PN90 (n=2 pour chaque vecteur). Nous avons ensuite évalué *in vivo* le profil d'expression de ces vecteurs dans le segment postérieur de chaque œil par l'examen du fond d'œil en fluorescence.

L'observation en fluorescence du fond d'œil de ces rats ne montre aucune expression du transgène GFP dans le segment postérieur de l'œil, que ce soit à 3 ou 10 semaines post-injection (**figure S4**).

Discussion des résultats expérimentaux

L'absence de transduction de la neurorétine suggère que les vecteurs scAAV2/8 et scAAV2/9 ne sont pas capables de franchir la barrière hémato-rétinienne chez le rat adulte, que ce soit au niveau des vaisseaux intra-rétiens qui sont complètement matures à PN90, ou au niveau de l'EPR.

Ceci peut s'expliquer par la très faible perméabilité passive de la barrière hémato-rétinienne pour les éléments circulants du sang (Bellhorn, 1981; Cunha-Vaz, 1966; Peyman et al., 1971). En effet, plusieurs études ont montré que la barrière hémato-rétinienne empêche le passage dans la rétine de solutés tel que le bleu de trypan, ou de petites protéines recombinantes telles que la micro-peroxydase (diamètre inférieure à 2,5nm), suite à leur administration intraveineuse chez le rat, le chat et le lapin (Cunha-Vaz, 1966), ou chez le primate adulte (Peyman et al., 1971).

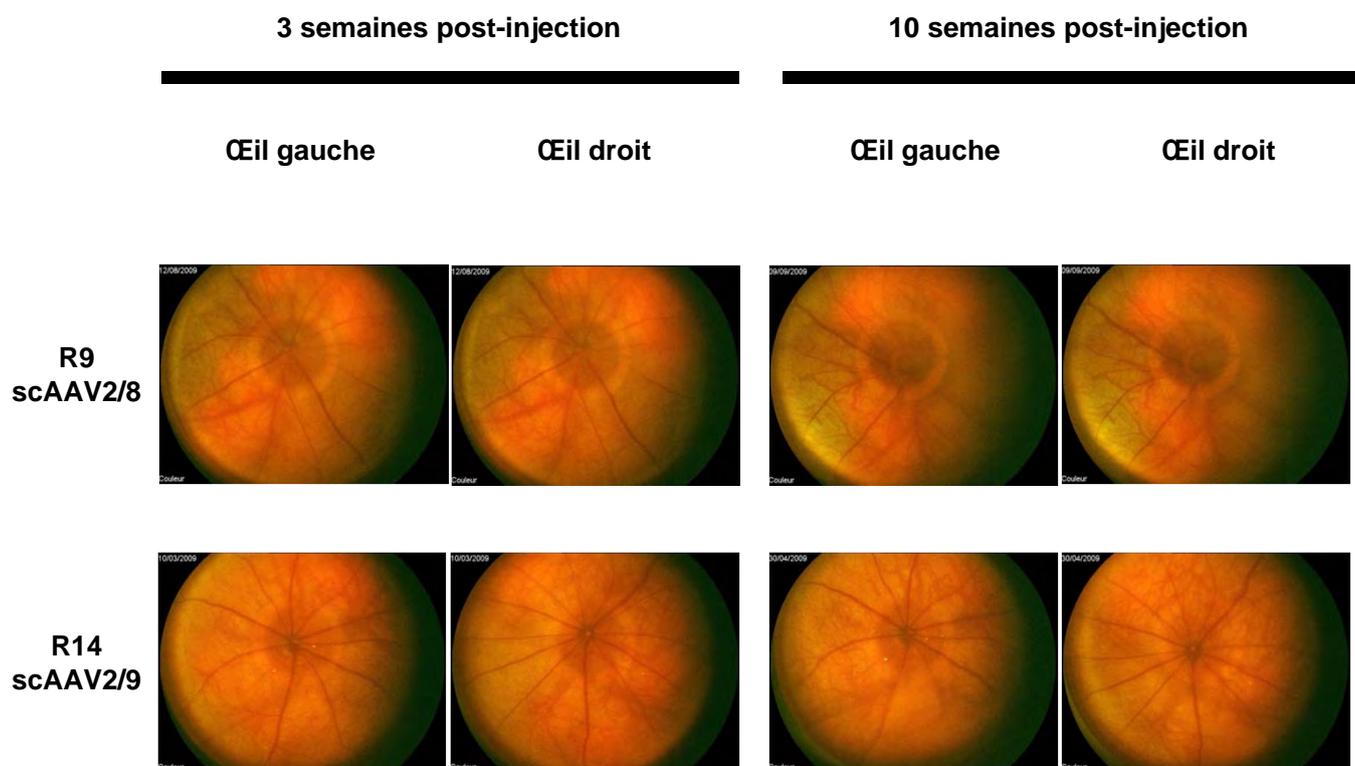


Figure S4. L'injection intraveineuse des vecteurs scAAV2/8.gfp et scAAV2/9.gfp chez le rat adulte, n'aboutit pas à l'expression efficace de l'eGFP dans le segment postérieur de l'œil.

Photographie en fluorescence du fond d'œil *in vivo* des rats R9 et R14, injectés respectivement avec les vecteurs scAAV2/8.gfp et scAAV2/9.gfp, par voie intraveineuse à 90 jours après la naissance.

Le fond d'œil de ces rats a été photographié en fluorescence à 3 semaines et 10 semaines post-injection.

Les résultats de notre étude montrent aussi que les vecteurs scAAV2/8.gfp et scAAV2/9.gfp ne permettent pas de transduire l'EPR du rat adulte après injection intraveineuse, contrairement à ce que nous avons observé chez le rat nouveau-né. Trois hypothèses pourraient expliquer ce changement de tropisme oculaire :

- Une première hypothèse serait que chez le rat adulte, les cellules de l'EPR ne sont plus permissives aux vecteurs scAAV2/8 et 2/9 *via* leur pôle basal. En effet, différentes études réalisées chez la souris ont montré que dans les jours qui suivent la naissance, les protéines de surfaces qui sont exprimées à la surface des cellules de l'EPR évoluent de façon importante ce qui modifie le phénotype moléculaire des cellules de l'EPR.

McKenna et coll. ont montré chez la souris que l'expression du récepteur de la laminine 37/67-KDa dans la rétine, et en particulier dans la choroïde et les cellules de l'EPR, est divisée par un facteur 8 entre PN1 et PN11 (McKenna et al., 2001). Or, ce récepteur a été identifié comme permettant l'entrée cellulaire des sérotypes d'AAVr 8 et 9 (**figure 15**) (Gao et al., 2004).

Ainsi, on pourrait imaginer que la modification du phénotype moléculaire des cellules de l'EPR pendant la période post-natale, puisse altérer fortement la capacité des vecteurs scAAV2/8.gfp et scAAV2/9.gfp à transduire les cellules de l'EPR entre PN1 et PN90, chez le rat.

- Une deuxième hypothèse serait que la maturation de la membrane de Bruch pendant la période post-natale, puisse former une barrière conjonctive suffisamment imperméable pour s'opposer au passage des vecteurs scAAV2/8 et 2/9 vers les cellules de l'EPR, chez le rat adulte.

La membrane de Bruch est une structure conjonctive qui fait l'interface entre les cellules de l'EPR et le choriocapillaris. Elle est organisée en 5 couches conjonctives superposées (**figure S3**) : 2 membranes basales externes respectivement accolées à l'EPR et au choriocapillaris, et 3 couches centrales de tissus conjonctifs de type collagène ou élastique (Booij et al., 2010b; Braekevelt and Hollenberg, 1970; Hirabayashi et al., 2003; Nakaizumi, 1964a).

Or, que ce soit chez la souris, le rat ou le chat, la membrane de Bruch est immature à la naissance, et en particulier les 3 couches conjonctives centrales (Braekevelt and Hollenberg, 1970 ; Greiner and Weidman, 1991; Hirabayashi et al., 2003). Après la naissance, celles-ci augmentent significativement en épaisseur et s'organisent en réseaux complexes.

De ce fait, on peut supposer que la membrane de Bruch, immature à la naissance, ne constitue pas à PN1 un obstacle à l'extravasation des vecteurs scAAV2/8 et 2/9 vers l'EPR, et le devienne à PN90 chez le rat.

➤ Finalement, une troisième hypothèse serait que certaines différences anatomiques et physiologiques entre le rat nouveau-né et adulte, pourraient influencer sur la stabilité systémique du vecteur scAAV2/9 ou encore sa concentration locale dans la circulation sanguine de l'œil, et plus généralement sur sa disponibilité locale dans l'espace choroïdien chez le rat adulte. Il semble cependant difficile d'identifier un facteur spécifique qui pourrait aller dans le sens de cette hypothèse.

1.2.3 Évaluation du tropisme oculaire du vecteur scAAV2/9 chez le chien et le chat, après administration intraveineuse à la naissance ou à l'âge adulte

Résultats expérimentaux

Dans un troisième temps, nous avons cherché à déterminer si l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp dans des modèles gros animaux (chien et chat) plus proches de l'homme que les rongeurs, permettrait la transduction des cellules de l'EPR, à l'instar de ce que nous avons observé chez le rat nouveau-né.

Dans ce but, nous avons injecté le vecteur scAAV2/9.gfp à la dose de 1.10^{12} vg/Kg, au niveau de la veine jugulaire, chez 2 chiens et 2 chats nouveaux nés (PN1), ainsi que chez 2 chiens et 2 chats adultes (PN60). Nous avons ensuite évalué *in vivo* le profil d'expression oculaire du vecteur scAAV2/9.gfp par examen du fond d'œil en fluorescence, afin de visualiser l'expression du gène rapporteur eGFP dans le segment postérieur de l'œil.

Les 2 chiens et les 2 chats injectés à PN1 sont nommés respectivement D1 et D2, et C1 et C2. Aucun de ces animaux, n'a reçu de traitement immunosuppresseur au cours de l'expérience.

Les 2 chiens et les 2 chats injectés à PN60 sont nommés D3 et D4, et C3 et C4. Le chien D4, et les chats C3 et C4 ont été immunosupprimés en continue pendant toute la durée de l'expérience (Cyclosporine et Mycophenolate mofetil), tandis que le chien D3 a été immunosupprimé avant l'injection du vecteur et jusqu'à 30 jours post-injection. L'arrêt du traitement immunosuppresseur chez le chien D3 a été motivé par les effets secondaires sévères induits par ce traitement chez ce chien.

Dans un premier temps, nous avons déterminé le tropisme oculaire du vecteur scAAV2/9.gfp chez les chiens (D1 et D2) et le chat (C1) nouveau-né après administration intraveineuse :

➤ Nous avons d'abord observé en fluorescence le fond d'œil des animaux injectés à PN1 pour y détecter l'expression de l'eGFP (D1, D2 et C1). Le signal fluorescent eGFP a été observé dans une grande partie du segment postérieur des yeux des chiens D1, D2 (**figure 3b et S5**) et du chat

C1 (**figure S6**). Le signal eGFP est fort, d'aspect moucheté. Celui-ci est principalement localisé dans la partie centrale et supérieure de la rétine, alors qu'il est absent de la partie périphérique de la rétine. L'expression oculaire du vecteur scAAV2/9.gfp est restée stable entre 1 et 3 mois post-injection (durée de l'expérience) (**figure 3b, S5 et S6**).

Les chiens et les chats contrôles, qui sont issue des mêmes portées et qui n'ont pas reçu le vecteur scAAV2/9.dgfp, ne présentent pas un signal fluorescent eGFP dans leur œil (**figures 3a, S5 et S6**). Nous y avons cependant observé une auto-fluorescence relativement forte associée au tapis qui est sous-jacent à l'EPR.

- L'analyse par microscopie à fluorescence des coupes de rétine des chiens D1 et D2 et du chat C1, a été réalisée à 3 mois post-injection, en prélevant des coupes de rétine au niveau de la zone tapétale de l'œil et en dehors. La zone tapétale de l'œil correspond à la région centrale de la rétine qui est associée avec le tapis (**figure S7**). Le tapis est une structure cellulaire réfléchissante propre aux chiens et aux chats, et dont le rôle est de réfléchir la lumière incidente vers la rétine.

Chez les chiens D1 et D2, l'eGFP est exprimée dans les cellules de l'EPR et les cellules du tapis (**figures 3a-c**). Des résultats similaires sont obtenus chez le chat C1 à 3 mois post-injection (**figures S8a-c**). Nous avons confirmé l'expression de l'eGFP dans les cellules de l'EPR par immunomarquage fluorescent de l'enzyme RPE65 spécifiquement exprimée par les cellules de l'EPR, et par la co-localisation du marquage fluorescent RPE65 (rouge) avec le signal fluorescent eGFP (vert) (**figures 4g-h et S8g-i**). Nous avons aussi observé que les cellules de l'EPR exprimant l'eGFP sont localisées exclusivement dans la zone tapétale du segment postérieur de l'œil (**figures 3a-c et S8a-c**), tandis que les cellules de l'EPR localisées en dehors de cette zone tapétale n'expriment pas l'eGFP (**figures 3d-f et S8d-f**). Nous estimons entre 20 et 40% la proportion des cellules de l'EPR présentes dans la zone tapétale de la rétine et exprimant l'eGFP. Une quantification histologique ou génomique plus précise par QPCR serait nécessaire pour déterminer précisément l'efficacité du transfert de gène dans les cellules de l'EPR.

Ces résultats montrent que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp chez le chien à PN1, aboutit à la transduction forte des cellules du tapis, et de façon sporadique pour les cellules de l'EPR localisées dans la zone tapétale.

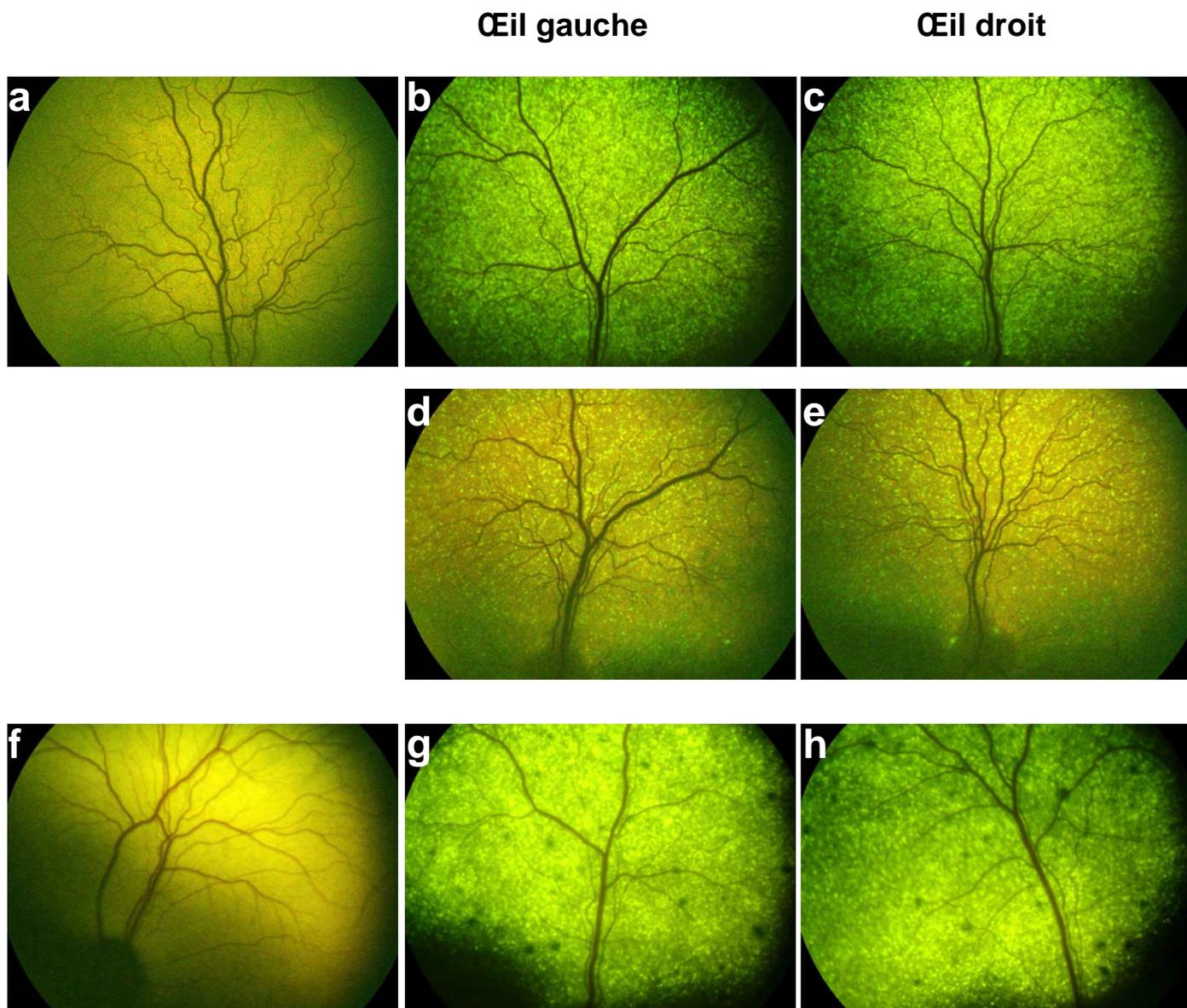


Figure S5. L'injection intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp chez le chien nouveau-né et adulte, aboutit à l'expression forte de l'eGFP dans le segment postérieur dans les deux yeux simultanément.

Photographie en fluorescence du fond d'œil *in vivo* des chiens D1 (**b, c**), D2 (**d, e**) et D4 (**e, f**) injectés par voie intraveineuse avec le vecteurs scAAV2/9.gfp, respectivement à PN1 et PN60.

Les fonds d'œil des chiens D1, D2 et D4 ont été photographiés à 10 semaines post-injection, avec leur contrôles respectifs (**a**) et (**f**) qui correspondent à des chiens non-injectés respectivement d'âge similaire aux chiens D1-D2 et D4.

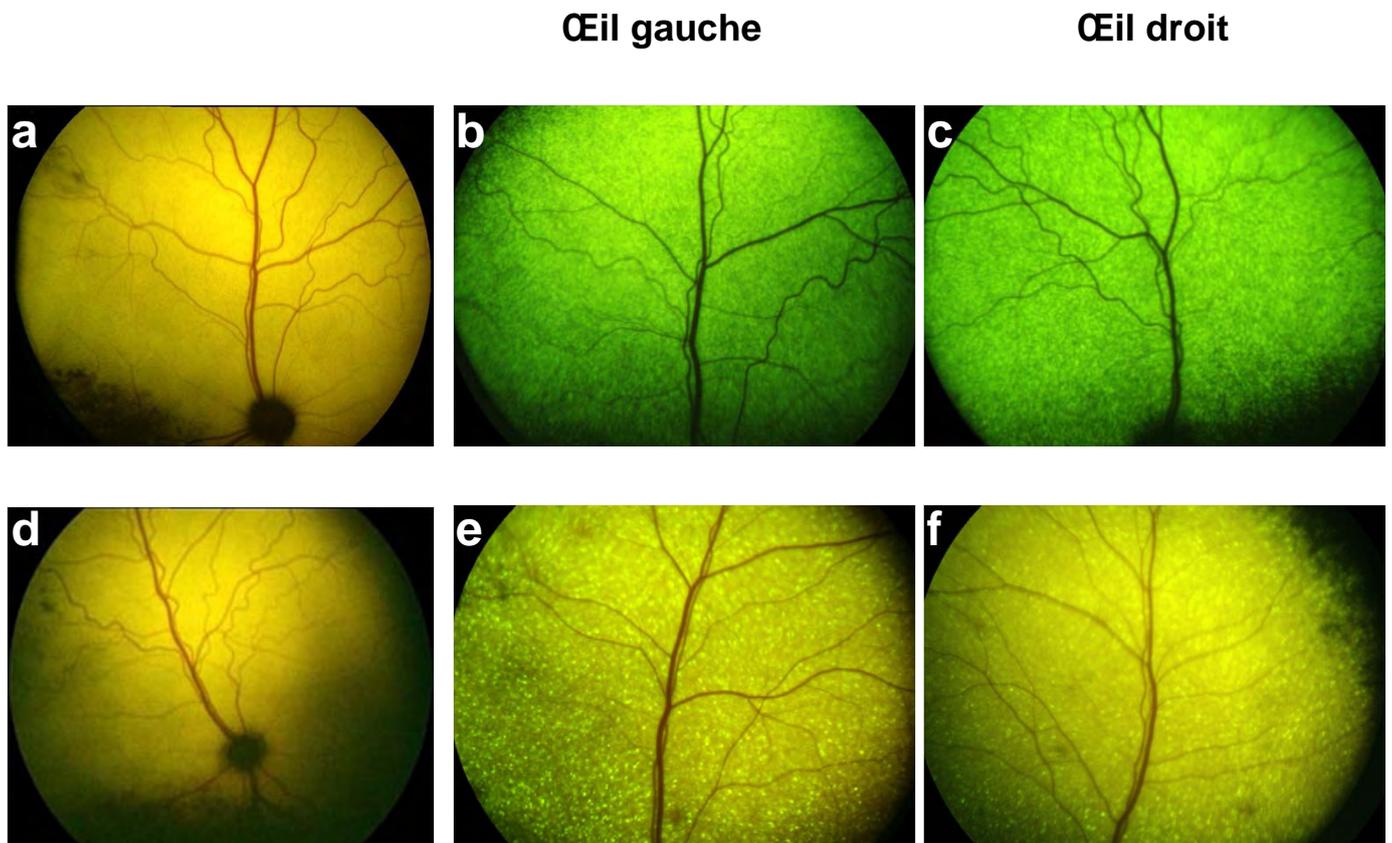


Figure S6. L'injection intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp chez le chat nouveau-né et chez le chat adulte, aboutit à l'expression forte de l'eGFP dans le segment postérieur dans les deux yeux simultanément.

Photographie en fluorescence du fond d'œil *in vivo* des chats C1 (**b, c**) et C3 (**e, f**) injectés par voie intraveineuse avec le vecteurs scAAV2/9.gfp, respectivement à PN1 et PN60.

Le fond d'œil des chats C1 (**b, c**) et C3 (**e, d**) a été photographié à 10 semaines post-injection, avec leur contrôles respectifs (**a**) et (**d**) qui correspondent à des chats non-injectés issus de la même fratrie que les chats C1 et C3.

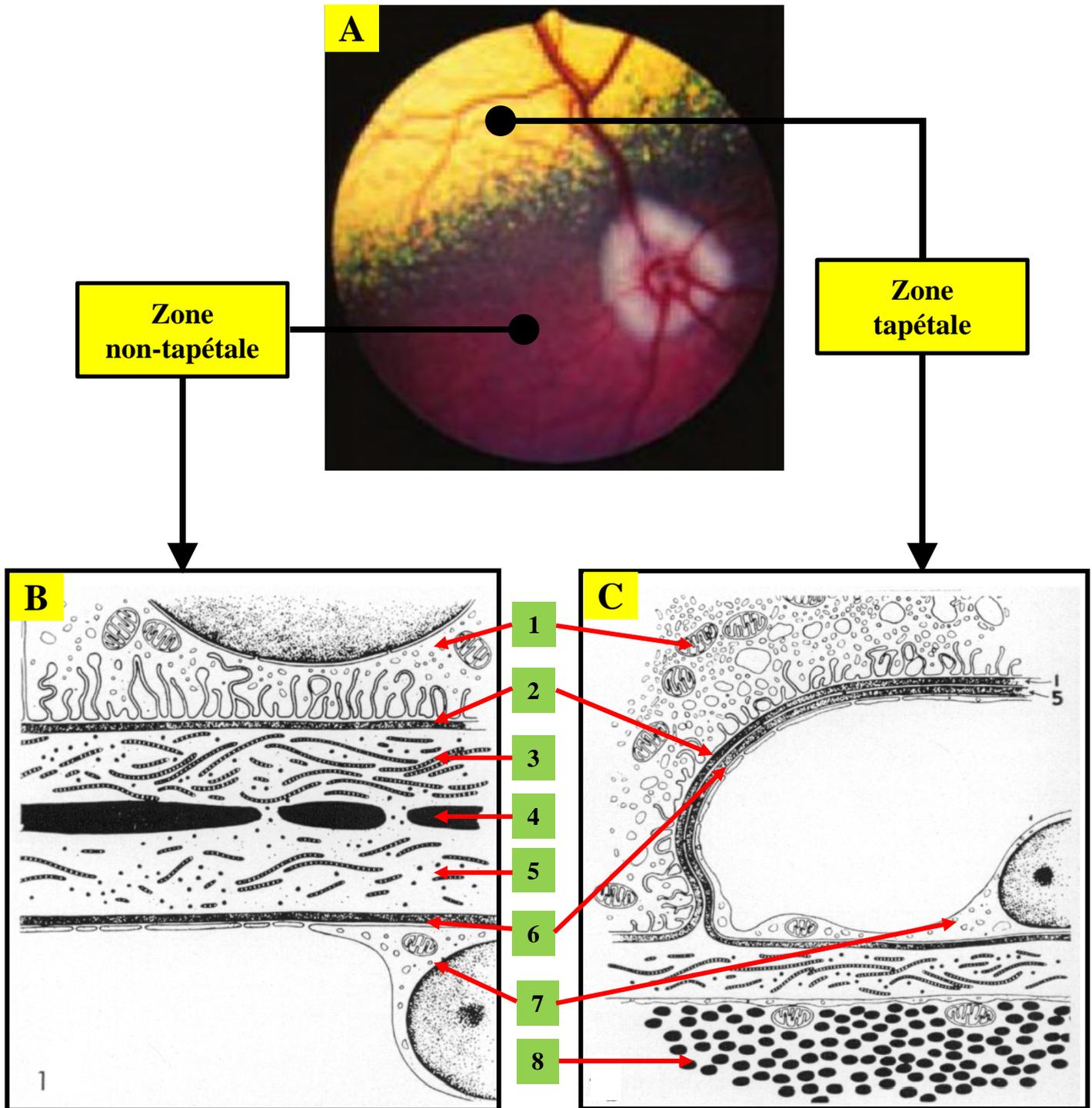


Figure S7. Schéma de la structure de la choroïde chez le chien, dans la zone tapétale et la zone non-tapétale du segment postérieur de l'œil.

(A) Photographie du fond d'œil d'un chien adulte sain, à la limite de la zone tapétale et de la zone non-tapétale.
 (B) Schéma représentant la structure de la choroïde et de la membrane de Bruch dans la zone non tapétale du segment postérieur de l'œil.
 (C) Schéma représentant la structure de la choroïde et de la membrane de Bruch dans la zone tapétale du segment postérieur de l'œil.

1. Cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.
3. Zone supérieure de fibres collagéniques.
5. Zone inférieure de fibres collagéniques.
7. Cellule endothéliale fenêtrée du choriocapillaris.

2. Membrane basale supérieure.
4. Zone intermédiaire de fibres élastiques.
6. Membrane basale inférieure.
8. Tapis (tapetum lucidum).

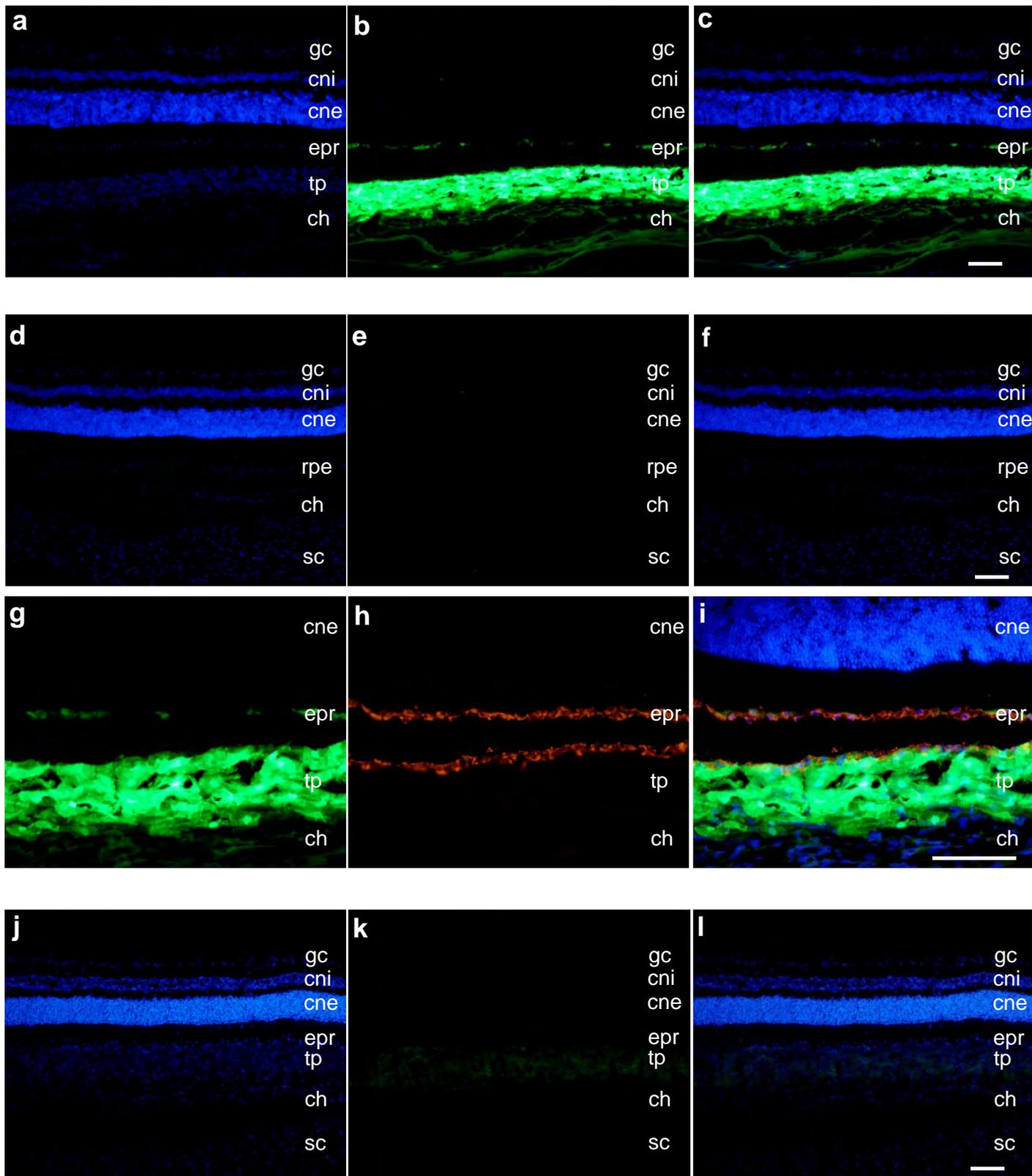


Figure S8. Coupes transversales de rétines de chats injectés avec le vecteurs scAAV2/9.gfp à 1 jours après la naissance, et observées au microscope à fluorescence 3 mois post-injection.

Coupes transversales de rétine d'un chat injecté à PN1 avec le vecteur scAAV2/9.gfp à la dose de 1.10^{12} vg/Kg (a-i), et d'un chat contrôle (j-l). Les coupes de rétine ont été prélevées dans la zone tapétale de l'œil (a-c, g-i, j-l) ou dans la zone non-tapétale de l'œil (d-f).

L'expression de l'eGFP (vert) a été observée sur les coupes de rétine après simple marquage de l'ADN nucléaire au DAPI (bleu), ou après immunomarquage de la protéine RPE65 (rouge) exprimée spécifiquement dans les cellules de l'EPR.

cg, cellules ganglionnaires; cni, couche nucléaire interne; cne, couche nucléaire externe; epr, épithélium pigmentaire rétinien; tp, tapetum lucidum; ch, choroïde; sc, sclère. Barre d'échelle = 100µm.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé le tropisme oculaire du vecteur scAAV2/9.gfp après administration intraveineuse à PN60 chez le chien (D3 et D4) et le chat (C3 et C4) :

- Nous avons d'abord observé en fluorescence le fond d'œil des animaux injectés à PN60 avec le vecteur scAAV2/9.gfp (D3, D4, C3 et C4), pour y détecter l'expression de l'eGFP.

Chez le chien D4 et les chats C3 et C4, le signal fluorescent eGFP a été observé dans une grande partie du segment postérieur, de façon similaire aux chiens D1, D2 et C1 (**figures 3d, S5 et S6**). Le signal fluorescent est fort, d'aspect moucheté, et localisé principalement au niveau de la partie centrale et supérieure de la rétine. L'expression oculaire du vecteur scAAV2/9.gfp chez les animaux D4, C3 et C4 est restée stable entre jusqu'à 3 mois post-injection (durée de l'expérience) (**figures 3d, S5 et S6**).

A l'inverse, les chiens et les chats contrôles issus des mêmes portées que D3, D4, C3 et C4, ne présentent pas de signal fluorescent eGFP, mais uniquement l'auto-fluorescence spécifique du tapis sous-jacent à l'EPR (**figures 3c et S4c**).

Chez le chien D3, le signal fluorescent eGFP a été observé comme fort dans le segment postérieur jusqu'à 30 jours post-injection. A 45 jours post-injection, soit 15 jours après l'arrêt du traitement immunosuppresseur, le signal fluorescent eGFP est indétectable dans le segment postérieur de l'œil (résultat non montré).

- L'analyse par microscopie à fluorescence des coupes de rétine du chien D4 et des chats C3 et C4, à 3 mois post-injection, révèle que l'eGFP est exprimée uniquement dans les cellules du tapis (**figures 5a-c et S9a-c**). Nous avons confirmé que les cellules de l'EPR n'expriment pas l'eGFP, en montrant que l'absence de co-localisation entre l'eGFP et le marquage de la protéine RPE65 (**figures 5g-i et S9g-i**). En dehors de la zone tapétale, nous n'avons pas observé l'expression de l'eGFP (**figures 5d-f et S9d-f**).

Discussion des résultats expérimentaux

Ces résultats montrent que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp chez le chien ou le chat, permet la transduction des cellules de l'EPR lorsque le vecteur est injecté à la naissance, mais pas lorsque le vecteur est injecté chez les animaux adultes. De la même façon que chez le rat nouveau-né et adulte, le tropisme oculaire du vecteur scAAV2/9 semble être dépendant de l'âge auquel il est administré. En outre, la transduction des cellules de l'EPR par le vecteur scAAV2/9.gfp, est restreinte aux cellules présentes dans la zone tapétale de l'œil qui correspond environ à un tiers de la surface totale de la rétine, et où les cellules du tapis sont transduites fortement par le vecteur scAAV2/9.gfp indépendamment de l'âge des animaux au moment de l'administration du vecteur.

L'absence de transduction de la neurorétine chez les chiens et les chats injectés à PN1 (**figures 4a-f et S8a-f**) comme à PN60 (**figures 5a-f et S9a-f**), peut s'expliquer de la même façon que chez les rats injectés à PN1 et PN90.

- À la naissance, le réseau vasculaire intra-rétinien est immature et très peu développé chez le chien comme chez le chat nouveau-né (Flower et al., 1985; Stone et al., 1995). En effet, celui-ci couvre moins de 10% de la surface de la rétine à PN1. L'administration systémique du vecteur scAAV2/9.gfp ne permet donc pas de transporter le vecteur directement dans la rétine *via* la vascularisation intra-rétinienne. De plus, nos résultats montrent qu'à PN1 le vecteur scAA2/9.gfp n'est pas capable de franchir l'EPR pour transduire la neurorétine.
- Chez les chiens et les chats injectés à PN60, l'absence de transduction de la neurorétine suggère que le vecteur scAAV2/9 n'est pas capable de franchir la barrière hémato-rétinienne au niveau des vaisseaux intra-rétiniens, lorsque ceux-ci sont complètement développés et matures, ou au niveau de l'EPR à l'âge adulte.

De manière surprenante, la transduction des cellules de l'EPR chez le chien nouveau-né, comme chez le chat nouveau-né, est restreinte à la zone tapétale de l'œil (**figures 4a-c et S8a-c**). Celle-ci correspond à la partie centrale du segment postérieur où la rétine est associée au tapis (**figure S7**). Ces résultats suggèrent que les cellules de l'EPR de la zone tapétale, sont plus facilement accessibles, et donc plus facilement transduites, que les cellules de l'EPR localisées en dehors de la zone tapétale. En effet, l'observation par microscopie électronique de la rétine de chien adulte par Nakaizumi, a mis en évidence que la structure et la composition de la membrane de Bruch sont différentes entre la zone tapétale (**figure S7b**) et non-tapétale (**figure S7c**) (Nakaizumi, 1964b). La membrane de Bruch est moins épaisse dans la zone tapétale (**figure S7b**). Les 3 couches conjonctives qui la constituent y sont très atrophiées, au point que les membranes basales associées au choriocapillaris et à l'EPR sont fréquemment accolées l'une à l'autre. Ainsi, il existerait moins d'obstacles à la transduction des cellules de l'EPR par le vecteur scAAV2/9, dans la zone tapétale qu'en dehors, en particulier au cours de la période néonatale lorsque la membrane de Bruch est immature

Au contraire, chez le chien et le chat adulte, la maturation de la membrane de Bruch pourrait contribuer à diminuer la capacité du vecteur scAAV2/9 à avoir accès aux cellules de l'EPR.

La transduction des cellules du tapis chez le chien nouveau-né, comme chez le chien adulte, est forte et couvre la totalité du tapis. La forte vascularisation du tapis par les vaisseaux fenêtrés du choriocapillaris, facilite probablement l'extravasation du vecteur scAAV2/9.gfp et la transduction des cellules du tapis.

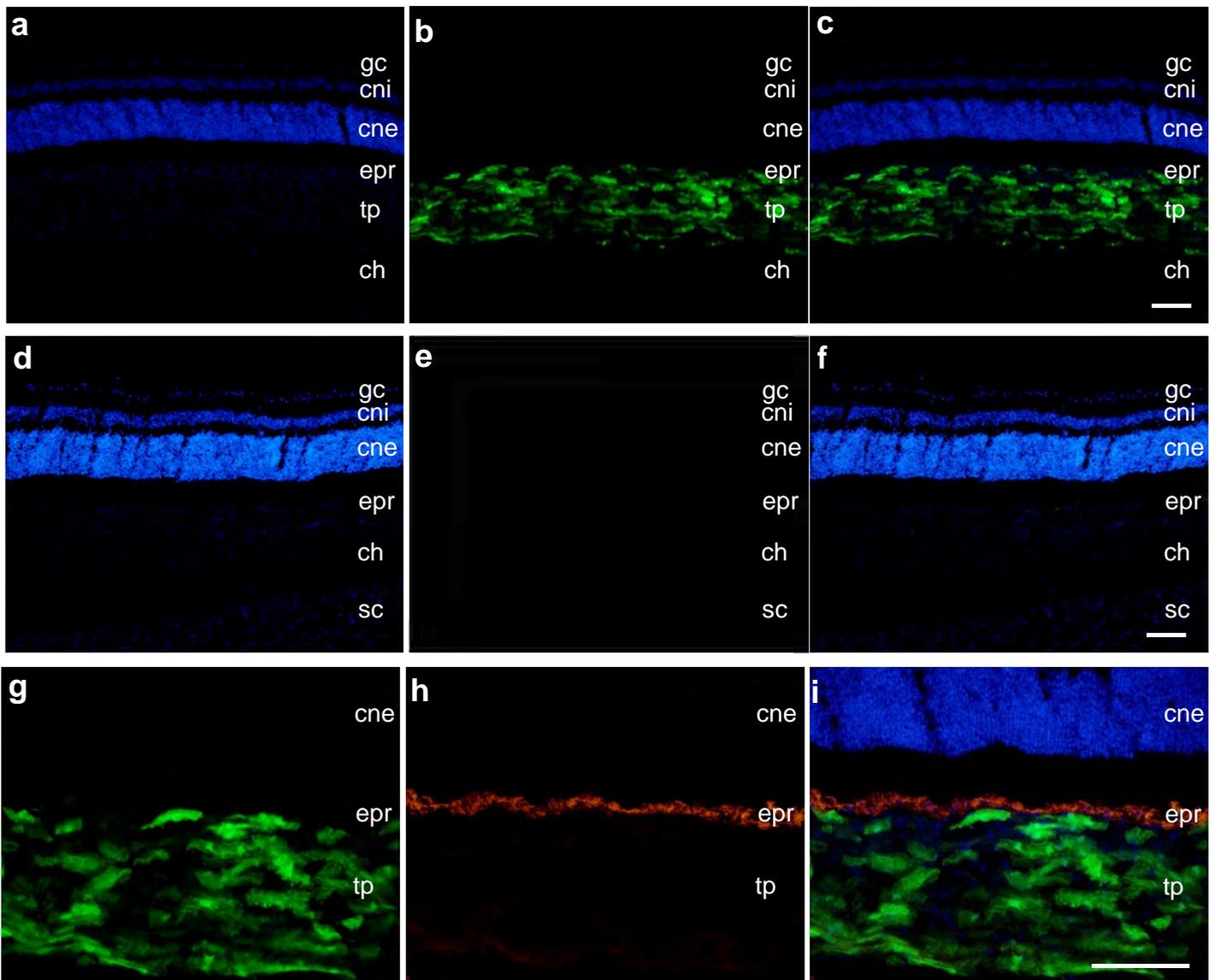


Figure S9. Coupes transversales de rétines de chats injectés avec le vecteurs scAAV2/9.gfp à 60 jours après la naissance, et observées au microscope à fluorescence 3 mois post-injection.

Coupes transversales de rétine d'un chat injecté à PN60 avec le vecteur scAAV2/9.gfp à la dose de 1.10^{12} vg/Kg (**a-i**), prélevées dans la zone tapétale de l'œil (**a-c, g-i**) ou dans la zone non-tapétale de l'œil (**d-f**).

L'expression de l'eGFP (vert) a été observée sur les coupes de rétine après simple marquage de l'ADN nucléaire au DAPI (bleu), ou après immunomarquage de la protéine RPE65 (rouge) exprimée spécifiquement dans les cellules de l'EPR.

cg, cellules ganglionnaires; cni, couche nucléaire interne; cne, couche nucléaire externe; epr, épithélium pigmentaire rétinien; tp, tapetum lucidum; ch, choroïde; sc, sclère. Barre d'échelle = 100µm.

1.2.4 Évaluation de la réponse immune chez le chien après administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 à PN1 et PN60

Résultats expérimentaux

Afin de mettre en évidence le développement d'une éventuelle réponse humorale contre le transgène ou la capsid du vecteur scAAV2/9.gfp chez les chiens et les chats injectés à PN1 ou PN60. Dans ce but, nous avons évalué avant l'injection du vecteur et 2 mois après, la présence dans le sérum des animaux injectés d'anticorps dirigés contre le transgène eGFP par western blot, et la présence d'anticorps contre la capsid AAV9 par un test de neutralisation. À ce jour, nous n'avons évalué que la réponse humorale chez les chiens injectés à PN1 et PN60.

L'évaluation de la présence d'anticorps sériques anti-eGFP a été réalisée en incubant les sérums des chiens, avant et après administration du vecteur scAAV2/9.gfp, avec une membrane de nitrocellulose sur laquelle nous avons fait migrer la protéine eGFP purifiée (**figure 3e**). La concentration des anticorps sériques anti-AAV9 a été évaluée en déterminant la dilution limite du sérum des chiens, suffisante pour induire 50% d'effet neutralisant *in vitro* sur l'efficacité de transduction du vecteur AAV9 sur des cellules HEK293.

Évaluation de la réponse immune chez les chiens injectés à PN1

L'analyse des sérums des chiens injectés à PN1 (D1 et D2), n'a pas révélé la présence d'anticorps anti-eGFP à 2 mois post-injection (**figure 3e**). Cependant, nous avons trouvé une concentration d'anticorps neutralisants anti-AAV9 relativement importante dans le sérum des chiens D1 et D2, avec un facteur de dilution limite de leur sérum égale à 1/100 (**table 2**).

Évaluation de la réponse immune chez les chiens injectés à PN60

L'analyse des sérums des chiens D3 et D4, avant l'administration du vecteur à PN60, n'a pas révélé la présence d'anticorps anti-eGFP (**figure 3e**), ni celle d'anticorps neutralisants anti-AAV9 (**table 2**).

L'analyse des sérums des chiens D3 et D4, 2 mois post-injection, révèle la présence d'anticorps anti-eGFP chez le chien D3 dont le traitement immunosuppresseur a été arrêté à 1 mois post-injection, mais pas chez le chien D4 dont le traitement immunosuppresseur a été continué (**figure 3e**). Il est intéressant de relever que la disparition du signal GFP observé chez le chien D3 est associée au développement d'une réponse humorale contre le transgène. A l'inverse, la persistance du signal GFP chez le chien D4 est associée à l'absence d'anticorps sérique contre l'eGFP.

Chez les chiens D3 et D4, nous n'avons pas détecté la présence d'anticorps neutralisant anti-AAV9 avant l'administration du vecteurs (**table 1**), tandis que nous avons détecté des anticorps neutralisants

chez ces 2 chiens à 2 mois post-injection (**table 1**). Il est intéressant de relever que la concentration en anticorps neutralisant est bien plus importante chez le chien D3, que chez le chien D4, avec respectivement des concentrations neutralisantes d'anticorps équivalentes à un facteur de dilution de 1/1000 pour D3 contre 1/50 pour D4 (**table 1**).

Discussion des résultats expérimentaux

Ces résultats montrent que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp induit le développement d'une réponse humorale contre la capsid du vecteur, indépendamment de l'âge d'administration du vecteur ou de l'administration d'un traitement immunosuppresseur. Ces résultats montrent aussi que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp à PN1 n'induit pas le développement d'une réponse humorale contre le transgène eGFP, même en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Ceci est d'autant plus surprenant que si le système immunitaire est partiellement mature chez le chien à la naissance (Ponder, 2007), il l'est complètement à l'âge de 2 mois. En outre, l'eGFP est exprimé non seulement dans l'EPR, mais aussi dans le tapis qui est localisé dans la choroïde qui est très vascularisé, et donc accessible pour les cellules immunocompétentes. Ceci nous porterait à suggérer que l'administration à la naissance du vecteur scAAV2/9.gfp n'induit pas non plus ultérieurement le développement d'une réponse immune à médiation cellulaire impliquant les LT CD8+ cytotoxiques.

Ceci est en cohérence avec plusieurs études récentes réalisées chez le chien nouveau-né, qui ont montré que l'administration néonatale d'un vecteur AAVr ou γ RV permet l'expression stable et à long terme d'un transgène potentiellement immunogène dans de nombreux organes, sans induire de réactions immunes délétères à son expression (Ponder et al., 2006; Traas et al., 2007; Weinstein et al., 2010; Yue et al., 2008).

Traas et coll. ont montré dans un modèle canin MPS I, que l'administration néonatale et intraveineuse d'un vecteur γ RV codant pour l'enzyme α -L-iduronidase, permet l'expression stable jusqu'à 18 mois post-injection du transgène dans de nombreux organes dont le foie, le cerveau, la rate, le cœur et les reins. De façon similaire, Weinstein et coll. ont montré que l'administration intraveineuse néonatale d'un vecteur ssAAV2/8 codant pour l'enzyme glucose-6-phosphatase (G6P) chez le chien déficient pour cette enzyme, peut être suivi à l'âge adulte d'une seconde administration systémique d'un vecteur ssAAV2/1 codant pour le même transgène, afin de renforcer le niveau d'expression *in vivo* du transgène, et ceci sans induire de réactions immunes délétères contre celui-ci (Weinstein et al., 2010). Les auteurs ont montré qu'il est ainsi possible d'obtenir une expression forte et stable du transgène thérapeutique G6P chez le chien adulte à plus de 18 mois post-injection, en l'absence de tout traitement immunosuppresseur.

Ces études et les résultats de notre étude semblent suggérer collectivement qu'il est possible de contourner le développement d'une réponse humorale, voir cellulaire, vis-à-vis d'un transgène, lorsque le vecteur thérapeutique (AAVr ou γ RV) est administré à la naissance par voie intraveineuse.

Ceci peut être expliqué en partie par l'immaturation du système immunitaire à la naissance, chez certains animaux tels que la souris, le chien et le chat. En effet, plusieurs études ont mis en évidence pendant la période néonatal (Ponder, 2007) :

- Le nombre de cellules présentatrices d'antigène (CPA) circulantes dans le sang est réduit chez le nouveau-né, par rapport à l'adulte. Or, ce sont ces CPA qui sont responsables en grande partie de l'initiation des réponses immunes adaptatives humorales et cellulaires spécifiques des antigènes générées par les vecteurs viraux ou l'expression du transgène (Nayak and Herzog, 2010).
- La sous-expression, chez le nouveau-né, des gènes exprimant les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-2 ou IFN γ , et dont le rôle est de stimuler le développement des réponses immunes adaptatives.
- La sous-expression, chez le nouveau-né, de certaines molécules de co-stimulation, nécessaires à la coopération entre cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les lymphocytes T (LT), telles que les molécules de surface cellulaire CD28 et CD40 ligand.

Chez les chiens injectés à l'âge adulte avec le vecteur scAAV2/9.gfp, nous avons observé chez l'un des deux animaux, le chien D3, la perte du signal GFP visible au fond d'œil. Ce phénomène est associé à l'arrêt au préalable du traitement immunosuppresseur, et à la mise en évidence d'anticorps anti-eGFP dans le sérum de ce chien à 2 mois post-injection.

L'une des hypothèses de travail que nous pourrions suggérer pour expliquer ce phénomène, serait le développement d'une réponse immunitaire délétère dirigée contre l'eGFP qui aurait conduit à l'élimination des cellules exprimant le transgène dans l'œil.

Au demeurant, nous ne pouvons pas l'affirmer de façon scientifiquement rigoureuse pour plusieurs raisons :

- D'une part, nous n'avons observé ce phénomène que chez un seul chien, ce qui ne permet pas de conclure sur la reproductibilité de ce phénomène.
- D'autre part, nous n'avons pas vérifié la persistance ou la disparition de l'expression de l'eGFP dans les organes périphériques très susceptibles aux réponses immunes (foie,

muscles, diaphragme, cœur...), et qui ont été transduits suite à l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9.gfp.

En conséquence, nous ne pouvons pas conclure à ce jour sur l'existence d'un lien de causalité entre ces trois évènements.

Notre étude a aussi montré le développement d'une réponse humorale vis-à-vis de la capsid du vecteur scAAV2/9.gfp indépendamment de l'âge d'administration systémique du vecteur. L'évaluation de la concentration sérique en anticorps neutralisants anti-AAV9, a montré une concentration relativement forte d'anticorps évaluée à une dilution limite en anticorps neutralisants moyenne entre 1/50 et 1/100, chez les chiens injectés à PN1 et PN60. Or, il est probable qu'une concentration sérique modérée ou importante en anticorps neutralisants, empêcherait la ré-administration efficace de ce même vecteur chez les chiens injectés à PN1 ou à PN60. En effet, Scallan et coll. ont montré que la transduction du foie par administration intraveineuse d'un vecteur ssAAV2/2 chez la souris, est complètement inhibée en présence d'une concentration d'anticorps neutralisants anti-AAV2, équivalent à une dilution limite en anticorps neutralisant égale ou inférieure à 1/10. Or, chez tous les chiens de notre étude, la concentration sérique en anticorps anti-AAV9 est entre 5 et 100 fois supérieure à ce seuil.

Cependant, il est probable que nous puissions administrer ultérieurement les chiens de notre étude, avec un vecteur AAVr de sérotype différent. En effet, Halbert et coll. ont montré que l'administration intra-pulmonaire répétée d'un vecteur ssAAV2/2 chez la souris immunocompétente, aboutit à l'absence presque totale de transfert de gène à la suite de la seconde injection (Halbert et al., 2000). Mais l'administration successive de 2 vecteurs de sérotype différent (ssAAV2/2 et ssAAV2/6), permet de s'affranchir de la réponse humorale et cellulaire générée contre le vecteur ssAAV2/2, et permet d'augmenter l'expression du transgène dans les poumons. De façon similaire, Weinstein et coll. ont montré récemment dans un modèle canin déficient pour l'enzyme G6P, que l'administration intraveineuse néonatale d'un vecteur ssAAV2/8 peut être suivie avec succès de l'administration d'un vecteur ssAAV2/1, malgré le développement d'une réponse humorale contre le vecteur ssAAV2/8 (Weinstein et al., 2010)

1.3 Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'il est possible de transduire les cellules de l'EPR dans les 2 yeux simultanément, après l'administration néonatale et intraveineuse d'un vecteur scAA2/9 chez le rat, le chien et le chat. Nous avons aussi montré la persistance et la stabilité de l'expression du transgène dans l'œil à plus de 2 mois post-injection, sans induire le développement d'une réponse immune délétère à l'expression du transgène. Cependant, nous avons aussi montré que la transduction des cellules de l'EPR chez l'animal nouveau-né n'est pas généralisée à l'ensemble des cellules de l'EPR. Chez le rat, l'administration systémique du vecteur scAAV2/9.gfp aboutit à la transduction d'environ 10-20% des cellules de l'EPR de façon dispersée dans toute la rétine, tandis que chez le chien et le chat, environ 20-40% des cellules de l'EPR sont transduites, mais uniquement dans la zone tapétale de la rétine. Finalement, nous avons montré chez le rat et le chien, que l'administration intraveineuse d'un vecteur scAAV2/9 chez l'animal adulte ne permet pas la transduction des cellules de l'EPR. En outre, la persistance de l'expression du transgène dans les cellules du tapis chez le chien injecté à PN60, est conditionnée par l'administration d'un traitement immunosuppresseur continu, à l'inverse des chiens injectés à PN1 chez qui aucun traitement immunosuppresseur n'est nécessaire. Ceci suggère donc la mise en place d'un phénomène de tolérisation vis-à-vis du transgène après l'administration intraveineuse du vecteur à PN1, mais pas à PN60.

Les principales applications thérapeutiques que l'on pourrait envisager pour ce mode d'administration, concerne le traitement des maladies dégénératives qui se déclarent dans les premières semaines de la vie où dont le diagnostic prénatal existe. Ce mode d'administration pourrait être particulièrement pour les pathologies affectant simultanément plusieurs organes parmi la liste suivante : la rétine, le système nerveux central, le cœur, le foie, les muscles squelettiques, la rate ou encore les reins.

De ce fait, les formes infantiles de la maladie de Batten, ou certaines formes de MPS, semblent des cibles particulièrement pertinentes (Ashworth et al., 2006; Bozorg et al., 2009; Poll-The et al., 2003). La MPS de type III, en particulier, se déclarent dans les 6 premiers mois de la vie de l'enfant, et elle induit une dégénérescence progressive de la rétine et l'encéphale, ainsi que des atteintes des systèmes musculosquelettiques, cardiovasculaires et respiratoires (Ashworth et al., 2006; Sands and Davidson, 2006).

Un traitement précoce par thérapie génique présenterait l'avantage de corriger les déficiences enzymatiques avant la mise en place de lésions histologiques et fonctionnelles irréversibles, en particulier pour les maladies graves ou fatales qui ont un déclenchement précoce et une progression

rapide, en plus de faire peser des risques vitaux important sur les patients. En outre, l'administration néonatale d'un vecteur AAVr permettrait de contourner la pré-immunité vis-à-vis des AAV qui est souvent rencontrée dans les populations humaines à l'âge adulte (Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009), mais qui est considérée comme négligeable avant l'âge de 6 mois (Blacklow et al., 1971; Chen et al., 2005).

Cependant, une évaluation de l'innocuité de ce protocole d'administration intraveineuse et néonatal du vecteur scAAV2/9 est indispensable dans le futur, ainsi que l'évaluation de son efficacité thérapeutique pour ce qui est du transfert de gène dans la rétine, avant toute considération clinique. Dans ce but, il serait particulièrement pertinent d'évaluer ce protocole

Dans ce but, nous allons prochainement évaluer la capacité de ce mode d'administration à restaurer l'expression du gène RPE65 dans les cellules de l'EPR chez le chien Briard RPE65^{-/-}, qui sont déficients pour l'enzyme RPE65 indispensable au cycle visuelle, et qui correspond à un modèle gros animal d'amaurose congénitale de Leber. Nous espérons ainsi évaluer l'efficacité thérapeutique de cette approche et plus précisément sa capacité à prévenir la perte de fonction de la rétine et sa dégénérescence, qui s'installent chez ces chiens vers l'âge de 4 à 9 mois. Il nous semblerait aussi particulièrement pertinent d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche dans les modèles canins de MPS II et VII qui sont caractérisés par des atteintes rétiniennes, encéphaliques, musculaires, squelettiques et cardiaques. Nous ne disposons pas malheureusement de ces modèles animaux dans notre laboratoire.

Afin de déterminer l'innocuité et la faisabilité clinique de ce protocole d'administration intraveineuse, il semble indispensable de l'évaluer chez le primate qui est un modèle animal préclinique plus proche de l'humain que le rat, le chien et le chat, du point de vue de l'anatomie oculaire, du système immunitaire, ainsi que d'un point de vue développemental.

- Du point de vue du développement oculaire, le développement de la rétine chez l'humain et le primate, a lieu au cours de la période prénatale, entre la 5^{ème} et la 18^{ème} semaine de développement embryonnaire pour l'humain, et entre la 4^{ème} et la 14^{ème} semaine de développement embryonnaire pour le primate (Finlay, 2008). À l'inverse, le développement de la rétine chez le chien et la souris commence pendant la période embryonnaire pour finir entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine après la naissance (Parry, 1953).
- En outre, le phénomène de « tolérisation » observé dans notre étude vis-à-vis du transgène, a été décrit dans plusieurs études comme dépendant de nombreux facteurs dont la nature du transgène, le niveau d'expression du transgène dans l'organisme, les organes ciblés, et surtout le niveau de maturité du système immunitaire au moment de l'administration du vecteur (Ponder, 2007). Or,

le système immunitaire chez l'humain est plus mature à la naissance que celui de la souris ou du chien, en particulier du point de vue de la fonction des cellules L_T CD8⁺ (Marchant et al., 2003; Siegrist, 2001; West, 2002).

De ce fait, l'évaluation de ce protocole d'administration intraveineuse et néonatale du vecteur scAAV2/9 chez le primate, aurait une valeur prédictive bien plus pertinente pour déterminer non seulement le tropisme oculaire et l'efficacité du transfert de gène dans la rétine chez l'humain, mais aussi l'innocuité dans l'œil et les autres organes.

En parallèle, nous pouvons aussi envisager différentes stratégies permettant d'augmenter l'efficacité du transfert de gène dans les cellules de l'EPR, et pour optimiser l'expression du transgène dans ces cellules.

- Le protocole d'administration pourrait être ainsi modifié pour augmenter la quantité de vecteur scAAV2/9 circulant dans l'œil, après administration systémique. En effet, l'administration du vecteur scAAV2/9 dans le système veineux favorise sa dispersion dans tout le système sanguin, mais ne favorise pas sa concentration dans la vascularisation oculaire. De ce fait, on pourrait imaginer administrer le vecteur par voie artérielle, et plus précisément au niveau de la carotide interne qui irriguent directement l'œil et le cerveau.
- Nous pourrions aussi envisager de co-administrer un inhibiteur réversible du protéasome avec le vecteur scAAV2/9, afin de diminuer la dégradation intracellulaire des vecteurs AAVr par le protéasome, et ainsi augmenter l'efficacité de transduction des vecteurs scAAV2/9 à MOI égale. En effet, Monahan al, ont montré que la co-injection d'un vecteur ssAAV2/2 ou ssAAV2/8, avec l'inhibiteur du protéasome « bortezomib », permet d'augmenter l'expression hépatique du transgène par un facteur 3 à 4, chez la souris et le chien (Monahan et al., 2010). De plus, Finn et coll. ont montré que cette stratégie permet aussi de diminuer ou de ralentir la présentation des peptides antigéniques dérivés de la capsid des vecteurs AAVr sur les récepteurs CMH I des hépatocytes murins, et donc diminuer l'activation du système immunitaire contre les cellules transduites (Finn et al., 2010).
- En outre, nous pourrions aussi envisager d'augmenter la dose du vecteur scAAV2/9 administré par la répétition de ces injections de façon très rapprochée pendant les 48 heures qui suivent la naissance.

- L'efficacité de transduction des cellules de l'EPR pourrait être éventuellement améliorée en évaluant d'autres sérotypes de vecteurs AAVr par administration intraveineuse néonatale, et en particulier le sérotype scAAV2/10. Récemment, Hu et coll. ont évalué l'administration intraveineuse du vecteur ssAAV2/10 chez la souris nouveau-née (Hu et al., 2010). Les auteurs ont comparé par bioluminescence *in vivo*, les profils d'expression de la luciférase après l'injection à PN2 des vecteurs ssAAV2/1 à ssAAV2/10 codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV, à la dose de 1.10^{13} vg/Kg. Les auteurs ont montré que le vecteur ssAAV2/10 permet d'induire l'expression du transgène la plus forte et la plus étendue dans tout le corps. De plus, les auteurs ont montré que le vecteur ssAAV2/10 permet une efficacité de transduction entre 2 et 10 fois plus grande que celle du vecteur ssAAV2/9, pour le cerveau, le cœur, les reins, le foie, les muscles squelettiques, les poumons, le pancréas et les intestins.
- Finalement, l'optimisation de la cassette d'expression pourrait permettre une augmentation significative de l'expression du transgène dans la rétine à nombre de copies égales de vecteur par cellule. Cette optimisation pourrait avoir lieu à 3 niveaux. **(1)** L'utilisation de promoteurs plus forts que le CMV, tel que le promoteur composite CAG. **(2)** L'intégration d'une séquence WPRE dans la région 3'UTR de la cassette d'expression, pour augmenter la concentration cellulaire des ARNm recombinants. **(3)** L'intégration d'une séquence consensus Kozack pour optimiser la traduction des ARNm recombinants en protéines.

2ème ETUDE

Effet de l'exposition à la lumière sur l'expression dans la rétine, d'un transgène sous le contrôle du promoteur CMV, après transfert de gène par vecteur AAV recombinant.

Brahim Belbellaa¹, Alexandra Mendes-Madeira¹, Nathalie Provost¹, Caroline Guihal¹, Philippe Moullier^{1,2}, and Fabienne Rolling^{1,#}.

¹INSERM UMR U649, Institut de Recherche Thérapeutique 1, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

²Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA.

2.1 Introduction

La thérapie génique constitue une approche prometteuse pour le traitement des pathologies dégénératives héréditaires de la rétine. Celles-ci affectent principalement les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Leur prévalence est estimée à 1 naissance sur 4000 (Hartong et al., 2006). L'identification d'une partie des gènes impliqués dans ces pathologies, a permis le développement de stratégies de thérapie génique.

Or, la réussite d'un protocole de transfert de gène thérapeutique, que ce soit dans l'œil ou dans d'autres organes, dépend principalement de 4 paramètres. **(1)** Une distribution efficace du vecteur dans les organes ciblés. **(2)** L'utilisation d'un vecteur ayant un bon tropisme pour les cellules d'intérêt, et permettant de transporter efficacement le transgène thérapeutique dans le noyau des cellules d'intérêt. **(3)** L'expression stable du transgène thérapeutique à un niveau adéquat. **(4)** La minimisation des réactions immunes et cytopathiques délétères au transfert de gène thérapeutique et associées au vecteur viral ou au transgène.

De ce fait, les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAVr) ont émergés comme des vecteurs de choix dans le développement de stratégies de thérapie génique pour le traitement des pathologies génétiques de la rétine. D'une part, les AAVr autorisent la transduction efficace de la plupart des types cellulaires de la rétine. D'autre part, les AAVr permettent une expression stable du transgène dans les cellules transduites, tout en induisant une réponse immunitaire minimale.

En outre, l'optimisation du transfert de gène passe également par l'optimisation des éléments génétiques qui composent la cassette d'expression. L'un des principaux leviers de cette optimisation repose sur le choix du promoteur qui permet de déterminer le niveau d'expression du transgène *in vivo*, ainsi que les types cellulaires dans lesquels le transgène sera exprimé (Surace and Auricchio, 2008). On distingue généralement 2 catégories de promoteurs recombinants : les promoteurs ubiquitaires et les promoteurs spécifiques. Les promoteurs ubiquitaires, tels que les promoteurs CMV ou CAG, induisent en générale une expression forte dans tous les types cellulaires de la rétine (Ali et al., 1996; Stieger et al., 2008). Les promoteurs spécifiques, tels que les promoteurs rhodopsine et rhodopsine kinase, restreignent l'expression du transgène à un seul type cellulaire, tout en induisant une expression plus ou moins forte du transgène (Khani et al., 2007; Zack et al., 1991). Ainsi, le choix du promoteur est crucial pour assurer un niveau d'expression du transgène suffisant pour induire un effet thérapeutique dans les cellules d'intérêt, et s'affranchir d'effets potentiellement délétères suite à l'expression non désirée du transgène, dans d'autres cellules.

Le promoteur recombinant CMV est un promoteur ubiquitaire d'origine virale, qui dérive du promoteur du gène viral IE1/2 du cytomégalo virus humain (CMV MIEP). Le promoteur recombinant CMV a été largement utilisé en transfert de gène dans la rétine, comme dans d'autres organes, car sa taille réduite (environ 600 pb), facilite son intégration dans les cassettes d'expression des vecteurs AAVr dont la capacité cargo est limitée à 4,7 Kb (Wu et al., 2010). En outre, il permet une expression forte dans de nombreux types cellulaires dont ceux de la rétine (Bennett et al., 1999; Stieger et al., 2008).

Or, le promoteur sauvage CMV MIEP est régulé dans de nombreux types cellulaires par plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription endogènes (**figure 26**). Ainsi, l'activation et l'inhibition du promoteur CMV MIEP sont dépendantes de l'activation ou de l'inhibition de ces voies de signalisations cellulaires, qui sont elles-mêmes régulées par des événements physiologiques ou pathologiques, tels que la différenciation cellulaire, la variation de l'activité électrophysiologique des cellules, la stimulation des cellules par des neurotransmetteurs ou encore des hormones (Sinclair and Sissons, 2006). Parmi les voies de signalisations identifiées comme régulant de façon puissante le promoteur sauvage CMV MIEP, Hunninghake et coll. ont mis en évidence que la stimulation de la voie de signalisation AMP cyclique (AMPc/PKA) permet d'induire fortement l'activation du promoteur CMV MIEP dans les L_T naïfs (Hunninghake et al., 1989; Sands and Palmer, 2008). De plus, les auteurs ont montré que cet effet est dépendant de la présence dans l'enhancer du promoteur sauvage CMV MIEP, de 5 séquences répétées de 19 pb. Or ces 5 séquences répétées portent chacune une séquence consensus de type « cAMP Responding Element » (CRE) : 5'-ATTGACGTCAAT-3'. Plus tard, Keller et coll., ainsi que Cuevas-Bennett and Shenk, ont montré que l'activation du promoteur CMV MIEP induite par la stimulation de la voie de signalisation AMPc/PKA, passe par la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription CREB/ATF (cAMP Responding Element Binding protein/Activating Transcription Factor), ainsi que par la fixation de ces facteurs de transcription au niveau de l'enhancer sur les séquences consensus CRE (Cuevas-Bennett and Shenk, 2008; Keller et al., 2007).

Il est important de noter que le promoteur recombinant CMV, conserve 4 des 5 séquences CRE dans sa séquence génétique, et que celles-ci sont fonctionnelles dans le contexte du transfert de gène *in vivo*. En effet, Salem et coll. ont construit un vecteur adénovirus exprimant le gène rapporteur β -galactosidase sous le contrôle du promoteur recombinant CMV, puis ce vecteur fut injecté *in vivo* chez le cochon afin de transduire les vaisseaux coronaires (Salem et al., 2006). Les auteurs ont ensuite montré que l'expression du transgène pouvait être inhibée à plus de 80% après

l'administration orale d'un β bloquant, qui induit l'inhibition de la voie de signalisation AMPc, et des voies de signalisation associées, dont dépend l'activation des facteurs de transcription CREB et ATF.

Les facteurs de transcription CREB/ATF sont ubiquitaires, et sont régulés de façon dynamique *in vivo* dans la plupart des cellules eucaryotes, par de nombreuses voies de signalisation (Mayr and Montminy, 2001). Ces voies de signalisation induisent l'activation des kinases cellulaires telles que la protéine kinase A (PKA) ou la protéine kinase G (PKG), qui à leur tour activent CREB/ATF en les phosphorylant. Ceci a pour conséquence la dimérisation de CREB/ATF sur les promoteurs présentant des séquences CRE, et le recrutement du complexe d'initiation de la transcription (Shaywitz and Greenberg, 1999). Or, ces voies de signalisation sont elles-mêmes régulées par une grande variété d'événements physiologiques et pathologiques, tels que les variations de potentiel membranaire, l'influx intracellulaire d'ions calcium (Ca^{2+}), la stimulation des cellules par des neurotransmetteurs ou des hormones, ou encore les variations de pH (Johannessen et al., 2004). Parmi ces voies de signalisation, les voies dépendantes de l'AMP cyclique (AMPc/PKA), et du GMP cyclique (GMPc/PKG) ont été décrites comme pouvant induire la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription CREB/ATF (**figures 27 et 28**) (Mayr and Montminy, 2001; Pilz and Casteel, 2003; Shaywitz and Greenberg, 1999).

Dans les photorécepteurs, ces voies de signalisation AMPc/PKA et GMPc/PKG ont été décrites comme étant fortement régulées par la lumière, *via* l'activation et l'inactivation de la cascade de phototransduction (**figure 28**) (Burns and Arshavsky, 2005; Jackson et al., 2009; Zhang and Cote, 2005). À l'obscurité, la cascade de phototransduction est inactive, et le GMPc est produit en abondance dans les photorécepteurs par l'enzyme guanylate cyclase (Farber et al., 1981; Orr et al., 1976). La forte concentration intracellulaire en GMPc ([GMPc]) induit l'ouverture de canaux ioniques $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dépendants du GMPc, et l'augmentation intracellulaire de la concentration en Ca^{2+} ([Ca^{2+}]). L'augmentation de [GMPc] induit l'activation de la voie signalisation GMPc/PKG. L'augmentation de [Ca^{2+}] induit l'activation de l'adénylate cyclase dépendante du Ca^{2+} et donc la production d'AMPc, ce qui induit l'activation de la voie AMPc/PKA. À la lumière, l'activation de la cascade de phototransduction induit l'hydrolyse du GMPc et la fermeture des canaux ioniques GMPc dépendants. En conséquence, la voie GMPc/PKG est inactivée, de même que la voie AMPc/PKA *via* l'inactivation de l'adénylate cyclase.

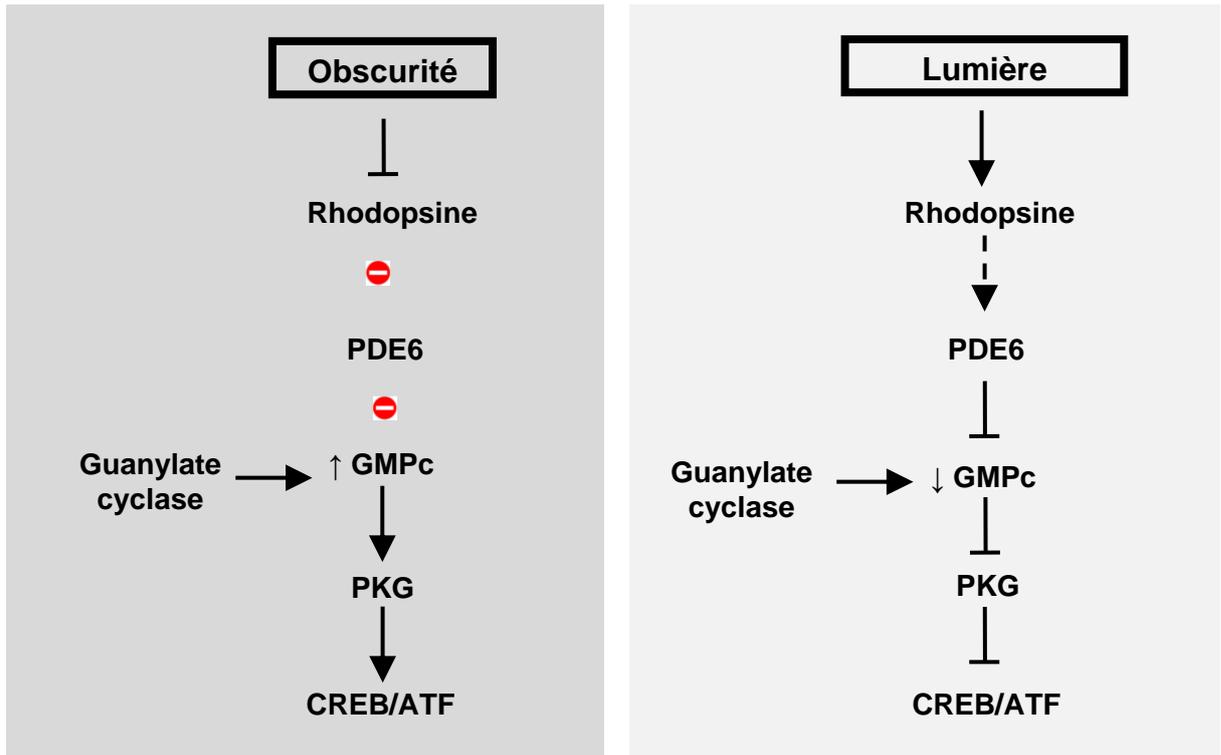
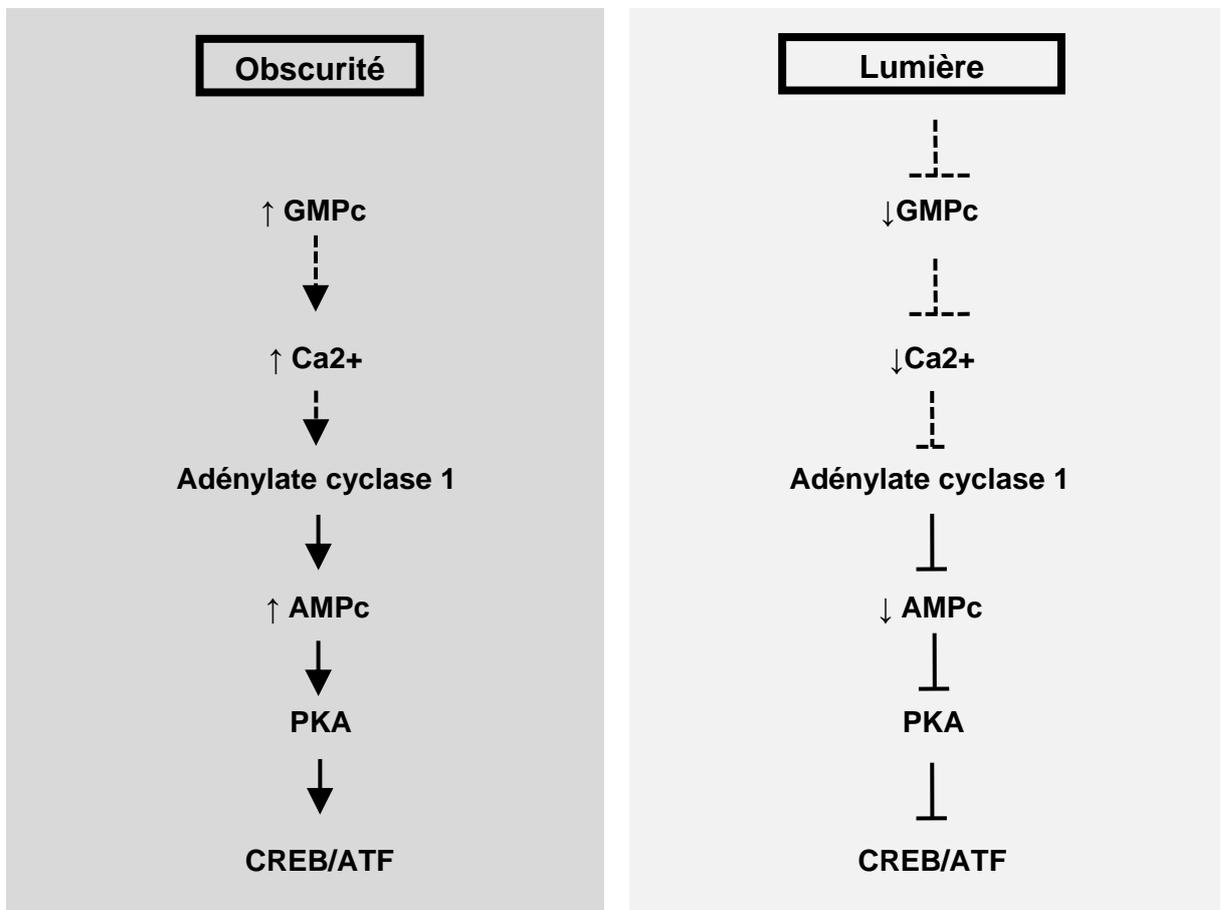
A*Régulation de la voie de signalisation GMPc/PKG dans les photorécepteurs***B***Régulation de la voie de signalisation de AMPc/PKA dans les photorécepteurs*

Figure 28 (début). Schéma des voies de signalisation associées à la cascade de phototransduction, et de leur régulation par la lumière et l'obscurité dans les photorécepteurs.

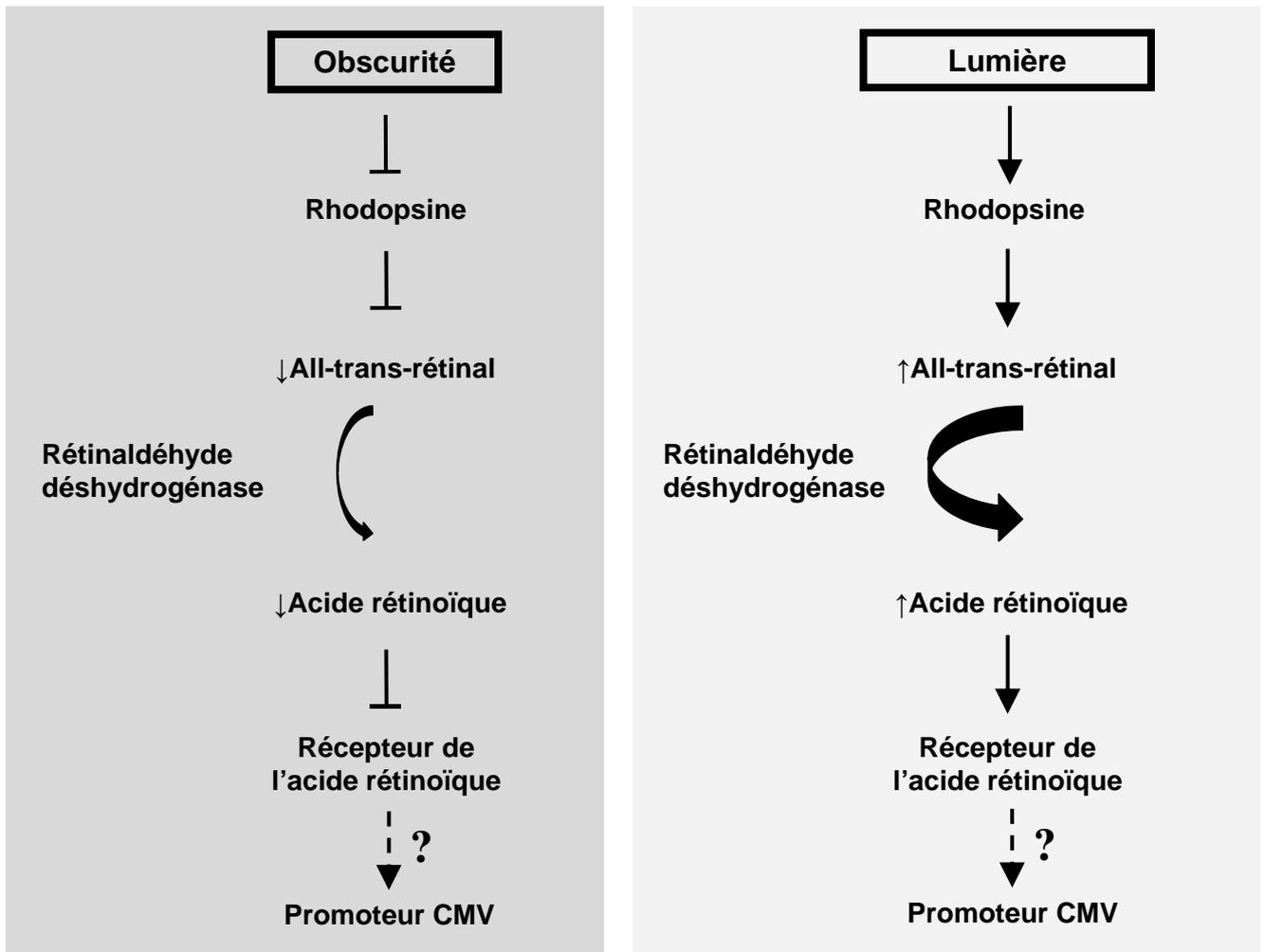


Figure 28 (fin). Schéma des voies de signalisation associées à la cascade de phototransduction, et de leur régulation par la lumière et l'obscurité dans les photorécepteurs.

(A) La voie de signalisation GMPc/PKG est régulée, entre autres, par la concentration intracellulaire en guanosine monophosphate cyclique ([GMPc]) qui est produite par la guanylate cyclase. A l'obscurité la [GMPc] est élevée, et induit l'activation de la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG). L'activation de PKG induit la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription CREB/ATF. A la lumière, la cascade de phototransduction est activée, et induit l'hydrolyse du GMPc via la phosphodiésterase PDE6. La diminution de la [GMPc] induit la perte de l'activation de PKG et donc de CREB/ATF.

(B) La voie de signalisation AMPc/PKA est régulée par la concentration intracellulaire en calcium ([Ca²⁺]). A l'obscurité la [GMPc] est élevée et induit l'ouverture de canaux ionique dépendant du GMPc. L'ouverture de ces canaux ioniques induit une augmentation de [Ca²⁺] et l'activation de l'adénylate cyclase 1 (AC1) des photorécepteurs. L'activation de l'AC1 induit la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), qui a son tour active la protéine kinase A (PKA). L'activation de PKA induit la phosphorylation et l'activation de CREB/ATF. A la lumière, l'activation de la cascade de phototransduction induit l'hydrolyse du GMPc, la fermeture des canaux ioniques dépendants du GMPc, la diminution de la [Ca²⁺], et pour finir l'inactivation de AC1 et PKA.

(C) La voie de signalisation de l'acide rétinoïque est activée à la lumière par la dégradation des photopigments en all-trans-rétinal (ATRA). L'ATRA est transformé en acide rétinoïque (AR) par l'enzyme rétinaldéhyde déshydrogénase. L'AR induit l'activation de facteurs de transcription : les récepteurs de l'acide rétinoïque qui ont été décrits comme activateur du promoteur CMV. À l'obscurité la concentration en ATRA et en AR diminue fortement, de même que l'activation des récepteurs à l'acide rétinoïque.

2.1.1. Objectifs de l'étude stratégies expérimentales

Le but de cette étude est de déterminer si les variations d'exposition à la lumière environnementale peuvent induire des variations d'expression d'un transgène lorsque celui-ci est sous le contrôle du promoteur recombinant CMV dans les photorécepteurs, et dans le contexte du transfert de gène par les vecteurs AAVr simple brin (ssAAV).

- Le premier objectif de cette étude a été d'évaluer un potentiel effet de la lumière *in vivo* sur l'expression de 2 gènes rapporteurs dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR de la rétine de rat. Les gènes rapporteurs que nous avons utilisés sont « l'enhanced green fluorescent protein » (eGFP) et l'eGFP déstabilisée (dGFP). L'expression dans la rétine de ces 2 protéines fluorescentes peut être suivie *in vivo* par un examen fluorescent du fond d'œil, et par l'observation de coupes de rétine au microscope à fluorescence. En outre, la dGFP présente l'avantage d'avoir une demi-vie courte (2 heures), qui permet de visualiser *in vivo* les variations importantes d'expression du transgène dans la rétine, si ces variations ont lieu sur une échelle de quelques heures (Folliot et al., 2003; Li et al., 1998).

Ainsi, nous avons construit des vecteurs AAVr de sérotypes 4 ou 5, exprimant l'eGFP ou la dGFP, sous le contrôle des promoteurs recombinants CMV, rhodopsine (RHO) ou rhodopsine kinase (RK), de façon à comparer dans les photorécepteurs l'effet de la lumière sur l'expression de ces transgènes lorsqu'ils sont dirigés par ces 3 promoteurs.

Les vecteurs AAVr de sérotype 4 ou 5 permettent de transduire les cellules de l'EPR seules, ou en association avec les photorécepteurs, après injection sous-rétinienne. Ceci permet d'évaluer séparément l'effet de la lumière sur l'expression d'un transgène dans les cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs.

Finalement, nous avons défini 2 conditions d'exposition à la lumière auxquelles nous avons soumis les rats injectés avec ces vecteurs. La 1^{ère} condition de lumière (L/O) correspond à un éclairage cyclique sur 24 heures : 11 heures de lumière à 40 Lux, puis 13 heures d'obscurité. La 2^{ème} condition de lumière (L/L) correspond à une exposition continue à la lumière 24 heures sur 24, à environ 350 Lux.

Nous avons ensuite placé les rats injectés avec ces vecteurs dans ces 2 conditions de lumière, pendant des périodes de 1 à 7 jours consécutifs, au cours desquelles nous avons suivi l'expression des gènes rapporteurs eGFP et dGFP, *in vivo* par examen du fond d'œil par fluorescence, puis par microscopie à épifluorescence sur coupes de rétine.

➤ Le deuxième objectif de cette étude a été de quantifier l'effet de l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression dans la rétine d'un transgène sous le contrôle du promoteur CMV. Dans ce but, nous avons construit le vecteur AAV2/5.CMV.EPO exprimant le transgène érythropoïétine de macaque (EPO) sous le contrôle du promoteur CMV. Lorsque le transgène EPO est exprimé dans la rétine, il présente l'avantage de sécréter la protéine EPO dans l'œil qui est quantifiable par dosage ELISA, après ponction de la chambre antérieure (PCA). On peut ainsi corrélérer la concentration intraoculaire en EPO ([EPO]), avec le niveau d'expression du vecteur dans la rétine, comme cela a été montré chez le primate au préalable par notre équipe (Stieger et al., 2006). Nous avons administré en sous-rétinien le vecteur AAV2/5.CMV.EPO chez des rats adultes, que nous avons placés successivement en condition L/O et L/L, puis nous avons dosé la [EPO] de ces rats en fonction des conditions de lumière.

Nous avons aussi eu pour objectif de quantifier les éventuelles variations du niveau des ARNm recombinants (ARNm EPO), induites par l'exposition prolongée à la lumière. Malheureusement, nous n'avons pu collecter que des résultats préliminaires qui seront abordés à la fin de cette étude.

➤ Le troisième objectif de cette étude a été de déterminer le rôle de la cascade de phototransduction et des voies de signalisation associées, dans l'effet inhibiteur de la lumière, sur l'expression du transgène EPO dans les photorécepteurs, après administration sous-rétinienne du vecteur AAV2/5.CMV.EPO. Dans ce but, nous avons cherché à activer ou inhiber *in vivo* les voies de signalisation AMPc/PKA, GMPc/PKG et de l'acide rétinoïque, à l'aide d'agents pharmacologiques. Ces agents pharmacologiques ont été sélectionnés sur la base d'une étude bibliographique (**Tableau 1**). Ces agents pharmacologiques ont été décrits comme étant des activateurs ou des inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation. Dans un premier temps, nous avons déterminé leur toxicité oculaire, et la dose maximale injectable. Dans un deuxième temps, nous avons administré l'un de ces agents pharmacologiques, le zaprinast, qui est un inhibiteur de la cascade de phototransduction chez des rats préalablement injectés avec un vecteur AAV2/5.CMV.EPO exprimant l'EPO sous le contrôle du promoteur recombinant CMV. Nous avons ensuite quantifié la concentration intraoculaire en EPO, en fonction des conditions de lumière L/O ou L/L, et en fonction de l'administration ou non de ces agents pharmacologiques.

2.2 MATERIEL ET METHODES

2.2.1 Construction des plasmides recombinants

Au cours de cette étude, nous avons construit cinq plasmides recombinants (**figure 29**) par digestions et ligations enzymatiques *in vitro*. Ces 5 plasmides dérivent tous du plasmide recombinant SSV9.CMV.eGFP décrit dans une étude précédente (Zhang et al., 1999) et qui porte les ITR de l'AAV2 :

- Le plasmide SSV9.CMV.eGFP porte le promoteur recombinant CMV, l'ADN complémentaire (ADNc) de l'eGFP et le signal de polyadénylation (polyA) SV40 qui dérive du virus simien 40. Le promoteur CMV a une taille de 603 pb, et dérive directement du promoteur viral du gène « immediate early gene 1 » (IE1) du virus cytomégalovirus humain.
- Le plasmide SSV9.CMV.dGFP a été construit en remplaçant l'ADNc de l'eGFP présent dans la cassette d'expression du plasmide SSV9.CMV.eGFP, par celui de la dGFP.
- SSV9.RHO.dGFP a été construit à partir du plasmide SSV9.CMV.dGFP, en remplaçant le promoteur CMV par le promoteur rhodopsine d'origine bovine (RHO) dont la taille est 2561 pb (Zack et al., 1991).
- SSV9.RK.dGFP a été construit à partir du plasmide SSV.CMV.dGFP, en remplaçant le promoteur CMV par le promoteur rhodopsine kinase d'origine humaine (RK) dont la taille est 204 pb (Khani et al., 2007).
- SSV9.CMV.EPO a été construit à partir du plasmide SSV9.CMV.eGFP en remplaçant l'ADNc de l'eGFP par celui de l'EPO, et le polyA SV40 par le polyA BGH polyA.

2.2.2. Production des vecteurs AAV recombinants

Au cours de cette étude nous avons utilisé 7 vecteurs AAVr produits à partir des plasmides recombinants cités ci-dessus. Ces vecteurs AAVr sont soit de sérotype 4, afin de pouvoir transduire exclusivement les cellules de l'EPR après injection sous-rétinienne, soit de sérotype 5, afin de transduire les cellules de l'EPR ainsi que les photorécepteurs après injection sous-rétinienne :

- Les vecteurs AAV2/4.CMV.eGFP et AAV2/5.CMV.eGFP ont été produits à partir du plasmide SSV9.CMV.eGFP, et leur concentration est respectivement de $3 \cdot 10^{11}$ et $10 \cdot 10^{11}$ génome vecteur par mL (vg/mL).
- Les vecteurs AAV2/4.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.dGFP ont été produits à partir du plasmide SSV9.CMV.dGFP, et leur concentration est respectivement $3 \cdot 10^{11}$ et $6 \cdot 10^{11}$ vg/mL.

- Le vecteur AAV2/5.RHO.dGFP a été produit à partir du plasmide SSV9.RHO.dGFP, et sa concentration est 16.10^{11} vg/mL.
- Le vecteur AAV2/5.RK.dGFP a été produit à partir du plasmide SSV9.RK.dGFP, et sa concentration est 9.10^{11} vg/mL.
- Le vecteur AAV2/5.CMV.EPO a été produit à partir du plasmide SSV9.CMV.EPO, et sa concentration est 25.10^{11} vg/mL.

Les vecteurs recombinants utilisés dans cette étude ont été produits par la plateforme de production de vecteurs précliniques de l'université de Nantes (www.vectors.nantes.inserm.fr). La méthode de production de ces vecteurs est la méthode de double transfection transitoire en cellules HEK293, dérivée de la méthode décrite par Rabinowitz et coll. (Rabinowitz et al., 2002). Les cellules HEK293 sont des cellules humaines embryonnaires transformées par l'intégration dans leur génome d'une copie du gène E1 de l'adénovirus.

Brièvement, les HEK293 sont transfectées avec deux plasmides recombinants par la méthode de précipitation de l'ADN par le phosphate de calcium. Le premier plasmide contient une cassette d'expression flanquée des ITR de l'AAV2, dans notre étude ce premier plasmide correspond à l'un des plasmides recombinants décrits dans la section précédente. Le second plasmide contient les différents gènes nécessaires à la production de l'AAVr qui sont (1) les gènes auxiliaires de l'adénovirus E2, E4 et VA, (2) le gène *REP* de l'AAV2 (3) le gène *CAP* spécifique du sérotype de l'AAV dans lequel on souhaite produire le vecteur. Les cellules HEK293 transfectées sont récoltées environ 46 à 72 heures post-transfection, puis lysées par plusieurs cycles de congélation-décongélation. La purification des particules se fait ensuite par ultracentrifugations sur gradients de chlorure de césium (Salvetti et al., 1998; Snyder and Flotte, 2002). La titration des vecteurs recombinants purifiés est ensuite effectuée par la méthode de dot-blot décrite par Salvetti et coll. (Salvetti et al., 1998).

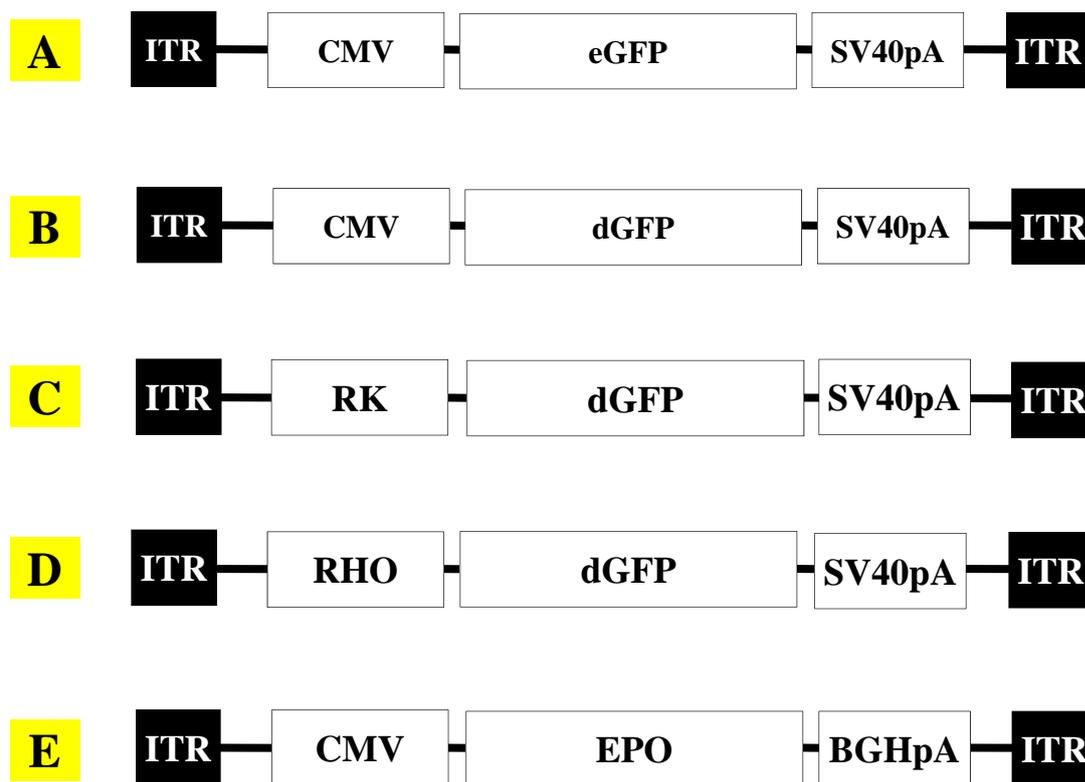


Figure 29. Schéma des vecteurs AAV recombinants (AAVr).

Le génome des vecteurs AAVr est flanqué des séquences ITR de l'AAV2, pour permettre la production des vecteurs AAVr et leur expression dans le noyau des cellules transduites. Chaque vecteur est composé d'une cassette d'expression formée d'un promoteur, d'un transgène sous la forme d'un ADN complémentaire (ADNc), et une séquence de polyadénylation (polyA).

(A) Vecteur exprimant la protéine fluorescente « enhanced green fluorescent protein » (eGFP) sous le contrôle du promoteur recombinant CMV de 603pb, et flanqué du SV40 polyA dérivé du virus simien 40.

(B) Vecteur exprimant la protéine fluorescente eGFP déstabilisée (dGFP) sous le contrôle du promoteur recombinant CMV, et flanqué du SV40 polyA.

(C) Vecteur exprimant la dGFP sous le contrôle du promoteur rhodopsine kinase humain (RK) de 204pb, et flanqué du SV40 polyA. Ce vecteur a été construit dans la plasmide SSV9.RK.dGFP.

(D) Vecteur exprimant la dGFP sous le contrôle du promoteur rhodopsine bovin (RHO) de 2561pb, et flanqué du SV40 polyA.

(E) Vecteur exprimant l'érythropoïétine de macaque (EPO) sous le contrôle du promoteur CMV, et flanqué d'un polyA dérivé du gène de l'hormone de croissance bovine (BGH polyA).

2.2.3. Injection sous-rétinienne des vecteurs AAVr

Cette étude a été réalisée sur des rats albinos Wistar adultes âgés d'environ 2 mois. Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la déclaration sur l'utilisation des animaux dans la recherche ophtalmologique de l'ARVO. L'ensemble des expériences *in vivo*, ont eu lieu à l'école vétérinaire de Nantes (ONIRIS), dans le centre de Boisbonne.

Les rats sont endormis par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (5%), puis par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (mg) et xylazine (mg). L'injection sous-rétinienne de ces vecteurs AAVr a été réalisée à la dose d'environ 1.10^9 vg par œil, pour un volume d'injection total de 4 à 5µL. La méthode d'injection sous-rétinienne utilisée est réalisée par voie trans-sclérale et trans-choroïdienne. Cette méthode a été décrite dans une étude précédente par Rolling et coll. (Rolling et al., 1999). Brièvement, la pupille des rats est dilatée par administration locale de tropicamide et de néosynéphrine. Un tunnel est ensuite percé à travers la tunique sclérale et la choroïde pour avoir accès à la rétine. Enfin, une seringue Hamilton à aiguille 33 gauge (33G) est chargée avec la solution de vecteur mélangée avec 1µL de fluorescéine diluée, puis l'aiguille est montée sur un cadre stéréotaxique. La seringue est insérée dans l'espace sous-rétinien, et la solution de vecteur y est injectée pour former une bulle d'injection entre l'EPR et les photorécepteurs. La présence de fluorescéine dans la solution de vecteur permet de visualiser la bulle d'injection sous-rétinienne par fluorescence à l'angiographe, et donc de vérifier que l'injection a été réalisée correctement.

Nous avons injecté les 7 vecteurs AAVr dans autant de groupes distincts de rats, afin de pouvoir évaluer l'effet de la lumière, le quantifier et évaluer l'effet d'agent pharmacologique sur l'expression dans la rétine :

- Afin d'évaluer dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, l'effet de la lumière sur l'expression *in vivo* d'un transgène dirigé par le promoteur CMV, nous avons procédé à l'injection sous-rétinienne des vecteurs suivants : AAV2/4.CMV.eGFP, AAV2/5.CMV.eGFP, AAV2/4.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.dGFP, AAV2/5.RHO.dGFP et AAV2/5.RK.dGFP. Chaque vecteur a été injecté de façon bilatérale chez 4 rats.

En outre, nous avons injecté les vecteurs AAV2/4.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.dGFP chez 4 rats supplémentaires pour chacun de ces vecteurs, afin de pouvoir analyser leur expression par microscopie à fluorescence.

- Afin de quantifier l'effet de la lumière sur l'expression d'un transgène sous le contrôle du promoteur CMV, dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, nous avons injecté le vecteur

AAV2/5.CMV.EPO chez 6 rats. Puis nous avons quantifié l'expression du transgène EPO en fonction des conditions de lumière.

- Afin de déterminer le rôle de la cascade de phototransduction et de la voie GMPc/PKG, dans l'effet de la lumière sur l'expression du transgène EPO dans la rétine, nous avons procédé à l'injection sous-rétinienne du vecteur AAV2/5.CMV.EPO chez 6 rats. Nous avons ensuite quantifié la concentration intraoculaire en EPO, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L, et en fonction de l'administration d'agents pharmacologiques.

2.2.4 Protocole d'exposition à la lumière

Au cours de cette étude, les rats ont été placés par couple, dans des cages transparentes, avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Les rats sont libres de leurs mouvements dans les cages. Les pièces dans lesquelles les rats ont été hébergés disposent d'un environnement régulé pour la température (environ 21°C) et pour la ventilation.

Au cours de cette étude, les rats ont été soumis alternativement à 2 conditions d'exposition à la lumière :

- La première condition de lumière (lumière/obscurité ou L/O) correspond à un éclairage cyclique sur 24 heures, constitué d'une période de 11 heures d'éclairage à 40-50 Lux, suivie d'une période de 13 heures d'obscurité. Cette condition de lumière correspond à ce qui est classiquement trouvé en animalerie rongeur, et correspond à une condition d'éclairage d'intensité faible.
- La seconde condition de lumière (lumière/lumière ou L/L) correspond à un éclairage continu, 24 heures sur 24, à une intensité d'environ 300 à 400 Lux. Cette condition de lumière correspond à une condition d'éclairage d'intensité modérée. Cette condition de lumière n'induit pas de lésions de la rétine, et seules des intensités beaucoup plus grandes, de l'ordre de 2000 Lux et plus, sont délétères pour la rétine (Allocca et al., 2007; Noell et al., 1966; Rattner et al., 2008).

2.2.5 Observation in vivo de l'expression des transgènes eGFP et dGFP

L'expression des gènes rapporteurs eGFP et dGFP dans la rétine, a été observée *in vivo* à l'aide d'un angiographe, chez tous les rats injectés avec un vecteur exprimant l'eGFP ou la dGFP. Le signal fluorescent émis par ces protéines eGFP et dGFP dans la rétine des rats a ainsi pu être photographié. Ces observations ont été réalisées après avoir endormi les rats par anesthésie gazeuse (isofluorane 5%) et à l'aide d'un angiographe Canon UIV (Lhedipoh Win Software, Lhéritier SA, Saint-Ouen-l'Aumône, France).

Les photographies des fonds d'œil en fluorescence ont été réalisées à heure fixe, entre 9h30 et vers 11h00 du matin, avec des paramètres d'acquisition propres à chaque animal tout au long de la cinétique d'observation.

2.2.6 Observation au microscope à fluorescence des rétines

Les rats ont été anesthésiés par injection intramusculaire de kétamine et de xylazine, puis euthanasiés par injection intracardiaque d'une dose létale de sodium de pentobarbital. Leurs yeux ont été ensuite énucléés et fixés par incubation dans un bain de para-formaldéhyde à 4%, pendant 40 minutes, à température ambiante.

Les yeux sont ensuite disséqués pour enlever le segment antérieur de l'œil, ainsi que le cristallin et le vitré. Le segment postérieur de l'œil est ensuite disséqué à l'aide d'un microscope opératoire, pour obtenir 4 pétales de segment postérieur. Chaque pétale de segment postérieur est constitué de la rétine, de la choroïde et de la sclère sous-jacente. Ces 4 pétales sont ensuite plongés dans un milieu d'inclusion cryo-protecteur, le tissutek (Sakara Finetek, Torrance, CA, USA), avant d'être congelés dans l'azote liquide.

Finalement, ces pétales sont coupés au cryostat (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France) pour obtenir des coupes congelées de 18µm d'épaisseur. Ces coupes sont ensuite, soit observées directement au microscope à épi-fluorescence (Nikon, Champigny-sur-Marne, France), soit colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) puis observées en microscopie à lumière blanche.

2.2.7 Dosage de la concentration intraoculaire en érythropoïétine

La concentration intraoculaire en érythropoïétine ([EPO]) des rats injectés avec le vecteur AAV5.CMV-EPO, a été dosée à partir d'échantillons de l'humeur aqueuse et à l'aide d'un kit de dosage ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) (Quantikine IVD, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Pour cela, les rats sont endormis par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (5%), puis une ponction de la chambre antérieure de l'œil est réalisée à l'aide d'une seringue à insuline 30G. La quantification de la [EPO] est réalisée par dosage ELISA et exprimée en milli unités internationales par mL (mUI/mL).

2.2.8 Préparation des agents pharmacologiques et évaluation de leur toxicité

Au cours de cette étude, nous avons souhaité déterminer le rôle de la cascade de phototransduction et des 3 voies de signalisation associées, dans l'effet de la lumière sur l'expression du transgène EPO dans les photorécepteurs. Ces 3 voies de signalisation sont schématisées **figure 28** : (A) la cascade de

phototransduction et la voie de signalisation GMPc/PKG, **(B)** la voie de signalisation AMPc/PKA, **(C)** la voie de signalisation de l'acide rétinoïque.

Pour cela, nous avons effectué une étude bibliographique avancée, et nous avons sélectionné 5 agents pharmacologiques activateurs ou inhibiteurs, et ciblant spécifiquement l'une de ces voies de signalisation :

- Le zaprinast (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) est un inhibiteur de l'enzyme phosphodiésterase 6 (PDE6) (**figures 6 et 28A**) (Zhang et al., 2005). PDE6 est une enzyme essentielle de la cascade de phototransduction, dont le rôle est d'hydrolyser le GMPc en GMP, et de diminuer la concentration intracellulaire en GMPc. De ce fait, PDE6 est aussi impliqué dans la voie de signalisation GMPc/PKG (Burns and Arshavsky, 2005).
- Le CPT-cAMP et le RP-cAMP (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) sont des analogues non dégradables de l'AMPc. Le CPT-cAMP est un activateur réversible de la voie de l'AMPc/PKA, tandis que le RP-cAMP est un inhibiteur réversible (**figure 28B**) (Fukuhara, 2004).
- Le all-trans-rétinal (Calbiochem, Nottingham, UK), et le RO 41-5253 (Enzo Life Sciences, Exeter, UK) sont respectivement un activateur et un inhibiteur des récepteurs de l'acide rétinoïque. Le promoteur recombinant CMV dispose de 3 sites de liaisons aux récepteurs de l'acide rétinoïque, dans sa séquence génétique (McVey et al., 2008).

Tous ces agents pharmacologiques ont été achetés sous forme de poudre déshydratée, puis dissouts dans une solution de tampon physiologique (Bausch&Lomb, Waterford, Ireland) pour les molécules CPT-cAMP et RP-cAMP, tandis que les molécules zaprinast, all-trans-rétinal et RO 41-5253 ont été dissoutes en diméthyle sulfoxyde.

La concentration des solutions mères pour ces différents agents pharmacologiques est 184mM pour le zaprinast, 5 mM pour le CPT-cAMP, 20 mM pour le RP-cAMP, 41mM pour le all-trans-rétinal, et 103 mM pour le RO 41-5253. Toutes les solutions d'agents pharmacologiques ont été diluées dans une solution tampon physiologique, avant d'être injectées *in vivo*.

Pour chaque molécule, la toxicité oculaire a été déterminée en administrant ces molécules à 3 concentrations croissantes, qui sont présentées dans le **tableau 1**. Afin de surveiller l'apparition d'événements inflammatoires ou dégénératifs dans les yeux des rats après l'injection de ces agents pharmacologiques, nous avons examiné le fond d'œil des rats pendant au moins 3 semaines post-injection.

Tableau 1 : Agents pharmacologiques ciblant la cascade de phototransduction et les voies de signalisation associées.

La concentration maximale non-toxique *in vivo* pour chaque molécule est surlignée en rouge.

Voie de signalisation	Agents pharmacologiques	Mode d'action des agents pharmacologiques	Concentrations testées pour évaluer la toxicité des agents pharmacologiques	Article scientifiques de référence
Cascade de phototransduction	activateur			
	inhibiteur	zaprinast (Sigma Aldrich)	200 µM, 1 mM, 10 mM	<i>In vitro</i> Barabas 2002 J Neuro Research : 200µM Barabas 2004 Neuro Letters : 200µM Paquet-Durand 2009 J Neurochem : 300µM <i>In Vivo</i> Yoon 2005 Neuro Letter : 36,7mM
	activateur	CPT-cAMP (Sigma Aldrich)	100 µM, 1 mM , 5 mM	<i>In vitro</i> Fukuhara 2004 J Neuro: 100µM <i>In vivo</i> Sen 1991 IOVS: 5mM Shen. 1999 Neuron: 1,25mM
AMPc/PKA/CREB-ATF	inhibiteur	RP-cAPM (Sigma Aldrich)	250 µM, 1 mM, 20 mM	<i>In vitro</i> Fukuhara. 2004 J Neuro : 250µM <i>In vivo</i> Cancedda 2003 J Neuro : 20mM Aragona and Wang 2007 J Neuro:10µM
	activateur	All Trans Rétnal (Calbiochem)	1 mM, 5 mM, 10 mM	<i>In vitro</i> Angulo and Ghazal 1996 J Virol : 10µM <i>In vivo</i> McVey 2008 Mol Ther: 1mM in vivo
Acide rétnoïque	inhibiteur	RO 41-5253 (Enzo Life Sciences)	20 µM, 500µM, 1 mM	<i>In vitro</i> Schapira 1999 PNAS : 20µM <i>In vivo</i> Toma 2004 Cancer Letters : 5µmole/jour

2.2.9 Analyses statistiques

Les moyennes et les déviations standards (SD) pour les différents groupes expérimentaux ont été calculées. L'analyse statistique des valeurs expérimentales a été réalisée par le test de Student non apparié ou apparié, à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla CA, CA, USA). On considère comme statistiquement significative, la différence entre 2 valeurs ou groupes expérimentaux, pour une valeur de p inférieure à 0,05.

2.3 RESULTATS

2.3.1 Évaluation de l'expression des transgènes eGFP et dGFP sous le contrôle du promoteur CMV, dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L

Dans la première partie de cette étude, nous avons cherché à déterminer l'effet de l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression de plusieurs vecteurs exprimant l'eGFP ou la dGFP sous le contrôle du promoteur CMV.

a. Évaluation de l'effet de la lumière dans les cellules de l'EPR

Afin de déterminer l'effet de l'exposition prolongée à la lumière sur l'expression de ces transgènes dans les cellules de l'EPR, nous avons administré à des rats adultes 2 vecteurs AAVr de sérotype 4 en sous-rétinien, dont le tropisme est restreint aux cellules de l'EPR (Weber et al., 2003) : les vecteurs AAV2/4.CMV.eGFP (n=4) et AAV2/4.CMV.dGFP (n=8).

Jusqu'à 1 mois post-injection, les rats injectés avec ces vecteurs ont été placés en condition L/O, puis l'expression des transgènes eGFP et dGFP dans les cellules de l'EPR a été observée *in vivo* par photographie du fond d'œil en fluorescence (**figures 30A et 31A**). L'expression de ces transgènes dans les cellules de l'EPR, se traduit par un signal fluorescent d'aspect moucheté ou piqueté, caractéristique de la forme hexagonale des cellules de l'EPR.

Nous avons ensuite placé successivement ces rats en condition de lumière cyclique (Lumière 11h : Obscurité 13h, L/O) et de lumière continue (Lumière/Lumière, L/L), pour des périodes de 4 jours consécutifs. À la fin de chaque période de 4 jours, nous avons observé et photographié l'expression des transgènes eGFP et dGFP dans l'EPR (**figures 30A et 31A**) :

- Après 4 jours en condition L/O, le signal fluorescent émis par l'eGFP et la dGFP est fort, et localisé uniquement dans les cellules de l'EPR, que ce soit pour les rats injectés avec le vecteur

AAV2/4.CMV.eGFP ou AAV2/4.CMV.dGFP. Nous n'avons pas observé de variations dans l'intensité ou la topographie du signal fluorescent au cours de la période d'exposition en L/O.

- Après 4 jours en condition L/L, le signal fluorescent dans la rétine des rats injectés avec les vecteurs AAV2/4.CMV.eGFP et AAV2/4.CMV.dGFP, est identique à ce qu'il était en condition L/O. Nous n'avons pas observé de variations d'intensité ou de topographie du signal, même après 10 jours d'exposition consécutifs en condition L/L.
- Nous avons confirmé ces observations, par l'analyse au microscope à fluorescence des coupes congelées des rétines de rats AAV2/4.CMV.dGFP exposées à ces 2 conditions de lumière (**figure 32B**).
- Le passage d'une condition de lumière à une autre, n'induit pas de variations dans l'intensité ou la topographie du signal fluorescent dans la rétine (**figure 30A et 31A**).

Ces résultats suggèrent que l'expression des transgènes eGFP et dGFP dans les cellules de l'EPR, n'est pas affectée par l'exposition prolongée à la lumière, lorsque ces transgènes sont sous le contrôle du promoteur CMV.

En outre, l'observation au microscope de ces coupes de rétine n'a pas mis en évidence d'effets délétères sur la rétine, suite à l'exposition prolongée à la lumière pour une intensité de 300-400 Lux.

Ces résultats suggèrent aussi que l'exposition des rats de façon prolongée à la lumière n'induit pas le bleaching de l'eGFP ou de la dGFP dans la rétine. Le phénomène de bleaching correspond à la diminution de l'intensité d'un signal fluorescent, suite à l'exposition prolongée ou intense à une source de lumière, ce qui induit la dénaturation de la protéine fluorescente. Ce phénomène a été observé et décrit *in vitro*, mais jamais *in vivo* à notre connaissance.

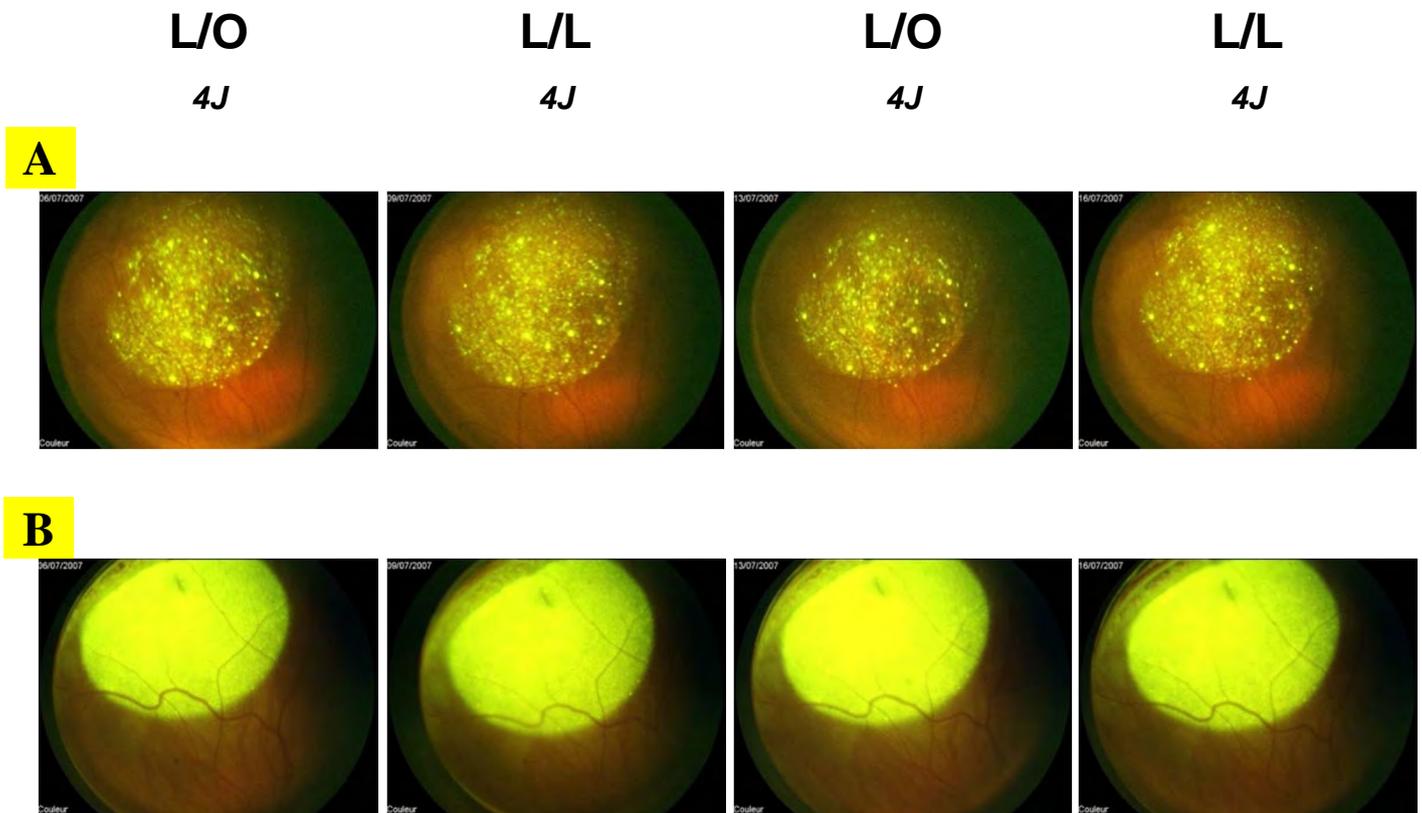


Figure 30. Observation *in vivo* de l'expression des vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.eGFP dans la rétine de rats, après exposition successive aux conditions d'éclairage L/O et L/L.

Les vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.eGFP ont été administrés en sous-rétinien chez des rats, pour transduire spécifiquement les cellules de l'EPR, ou en association avec les photorécepteurs.

A 1 mois post-injection les rats injectés ont été placés alternativement dans les conditions de lumières L/O et L/L, pendant des périodes de 4 jours consécutifs, puis l'expression de l'eGFP dans la rétine a été observée par photographie du fond d'œil en fluorescence. La condition de lumière L/O correspond à un éclairage cyclique sur 24 heures (11 heures de lumière à 40 Lux: 13 heures d'obscurité), tandis que la condition de lumière L/L correspond à un éclairage continu 24 heures sur 24, à 300-400 Lux.

(A)Expression de l'eGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/4.CMV.eGFP. En conditions L/O et L/L, l'expression de l'eGFP est restreinte aux cellules de l'EPR. L'exposition alternée aux conditions de lumière L/O et L/L, n'induit pas de modification du profil d'expression de l'eGFP dans la rétine.

(B)Expression de l'eGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/5.CMV.eGFP. En conditions L/O et L/L, l'expression de l'eGFP est localisée dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs. L'exposition successive aux conditions de lumière L/O et L/L, n'induit pas de modification du profil d'expression de l'eGFP dans la rétine.

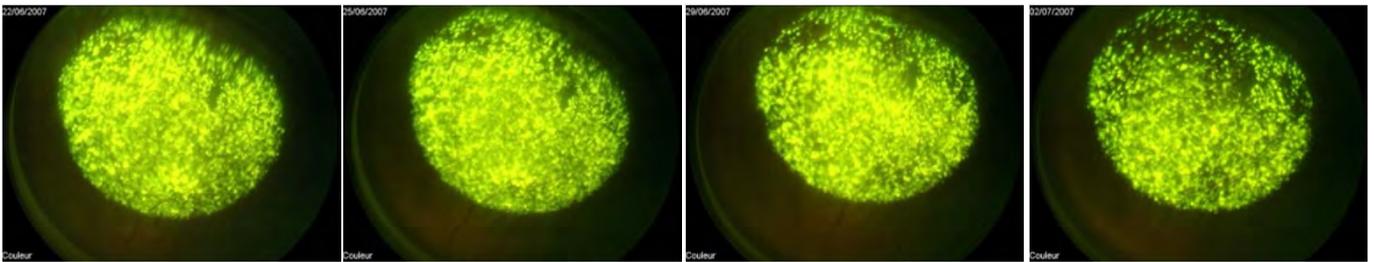
L/O
4J

L/L
4J

L/O
4J

L/L
4J

A



B

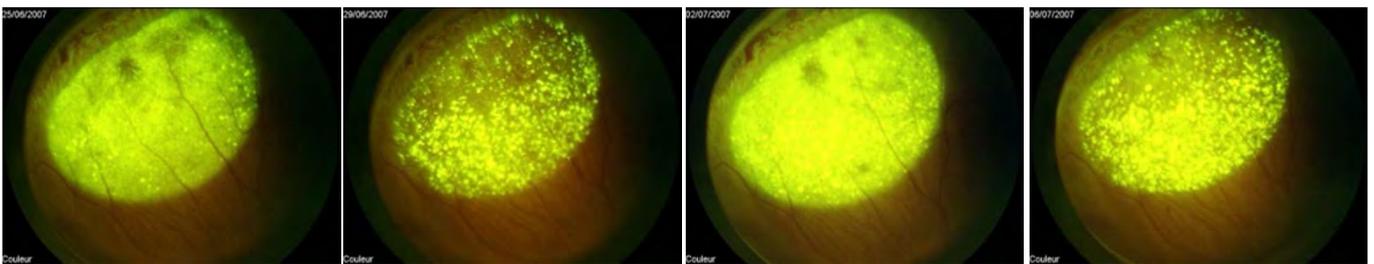


Figure 31. Observation *in vivo* de l'expression des vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP dans la rétine de rats, après exposition alternée aux conditions d'éclairage L/O et L/L.

Les vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP ont été administrés en sous-rétinien chez des rats adultes, pour transduire spécifiquement les cellules de l'EPR seules, ou en association avec les photorécepteurs.

A 1 mois post-injection les rats ont été placés successivement dans les conditions de lumières L/O et L/L, pendant des périodes de 4 jours consécutifs, puis l'expression de la dGFP dans la rétine a été observée par photographie du fond d'œil en fluorescence.

(A) Expression de la dGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/4.CMV.dGFP. En conditions L/O et L/L, l'expression de la dGFP est restreinte aux cellules de l'EPR. L'exposition successive des rats aux conditions de lumière L/O et L/L, n'induit pas de modifications du profil d'expression de la dGFP.

(B) Expression de la dGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/5.CMV.dGFP. En condition L/O, l'expression de la dGFP est localisée dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, tandis qu'en condition L/L, l'expression de la dGFP est localisée uniquement dans les cellules de l'EPR. L'exposition successive des rats aux conditions de lumière L/O et L/L, induit la disparition du signal fluorescent dans les photorécepteurs de façon réversible et reproductible.

b. Évaluation de l'effet de la lumière dans les photorécepteurs.

De la même façon, nous avons cherché à déterminer l'effet de l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression de ces transgènes dans les photorécepteurs. Dans ce but, nous avons administré à des rats adultes, 2 vecteurs AAVr de sérotype 5 en sous-rétinien, dont le tropisme permet la transduction des photorécepteurs et des cellules de l'EPR (Lotery et al., 2003; Yang et al., 2002) : les vecteurs AAV2/5.CMV.eGFP (n=4) et AAV2/5.CMV.dGFP (n=8).

L'expression de ces 2 vecteurs AAV2/5, se traduit dans les photorécepteurs par un signal fluorescent d'aspect fin, uniforme et homogène dans la rétine, qui se superpose au signal fluorescent d'aspect moucheté émis par les cellules de l'EPR (**figures 30B et 31B**).

A 1 mois post-injection, nous avons placé successivement les rats injectés en conditions L/O et L/L, pour des périodes de 4 jours consécutifs. À la fin de chaque période de 4 jours, nous avons observé et photographié l'expression des transgènes eGFP et dGFP dans les photorécepteurs et l'EPR (**figures 30B et 31B**).

Nous avons d'abord observé l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.eGFP dans la rétine en fonction des conditions de lumière L/O et L/L. Ce vecteur exprime la protéine eGFP qui est utilisé classiquement en transfert de gène *in vivo*, et dont la demi-vie est d'environ 48-72 heures.

- Après 4 jours en condition L/O, le signal fluorescent émis par l'eGFP est intense dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR (**figure 30B**). Nous n'avons pas observé de variations dans l'intensité ou la topographie du signal fluorescent au cours de la période d'exposition en L/O.
- Après 4 jours en condition L/L, le signal fluorescent émis par l'eGFP dans la rétine, est identique à ce qu'il était en condition L/O (**figure 30B**).
- Le passage successif d'une condition de lumière à l'autre, n'induit pas de variations d'intensité ou de topographie du signal fluorescent dans la rétine.

Nous avons ensuite observé l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.dGFP dans la rétine, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L. Ce vecteur exprime la protéine eGFP déstabilisée (dGFP) dont la demi-vie est d'environ 2-4 heures.

- Après 4 jours en condition L/O, le signal fluorescent émis par la dGFP est intense et stable dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, pour les rats injectés avec les vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP. Nous n'avons pas observé de variations dans l'intensité ou la topographie du signal fluorescent au cours de la période d'exposition en L/O (**figure 31B**).

- Cependant, après 4 jours d'exposition à la condition L/L, le signal fluorescent émis par la dGFP disparaît complètement des photorécepteurs, mais persiste à l'identique dans les cellules de l'EPR, chez les rats injectés avec le vecteur AAV2/5.CMV.dGFP (**figure 31B**).
- L'analyse en microscopie à fluorescence de coupes de rétines de rats injectés avec le vecteur AAV2/5.CMV.dGFP, a permis de confirmer qu'en condition L/O, l'expression de la dGFP est présente dans les photorécepteurs et les cellules de l'EPR, tandis qu'en condition L/L, la dGFP est exprimée uniquement dans les cellules de l'EPR (**figure 32A**).
- Le passage de la condition L/O à L/L ou inversement, induit la modification systématique du profil d'expression de la dGFP dans la rétine pendant toute la cinétique (**figure 33**) :
 - Le passage de la condition L/O vers la condition L/L, induit dans les 24 à 48 heures qui suivent l'exposition à la condition L/L, la disparition du signal dGFP présent dans les photorécepteurs. Le signal fluorescent dans les cellules de l'EPR reste quant à lui stable.
 - Le passage de la condition L/L vers la condition L/O, induit dans les 24 à 48 heures qui suivent l'exposition à la condition L/O, la réapparition du signal dGFP dans les photorécepteurs. Le signal fluorescent dans les cellules de l'EPR reste quant à lui stable.

Ces résultats montrent pour la première fois, que l'exposition prolongée à la lumière induit la répression du vecteur AAV2/5.CMV.dGFP sous le contrôle du promoteur CMV, dans les photorécepteurs mais pas dans les cellules de l'EPR.

Nous avons aussi montré que ces variations d'expression ne peuvent être observées qu'avec l'aide du gène rapporteur dGFP. La différence d'expression des vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.eGFP dans la rétine en fonction des conditions de lumière, s'explique par la différence importante de stabilité cellulaire entre l'eGFP et la dGFP. La demi-vie courte de la dGFP (≤ 2 heures) ne permet pas l'accumulation intracellulaire de la dGFP, et permet ainsi de visualiser *in vivo* et en « temps réel », les variations d'expression du transgène dGFP dans la rétine (Folliot et al., 2003), contrairement à l'eGFP qui a une latence cellulaire beaucoup trop importante.

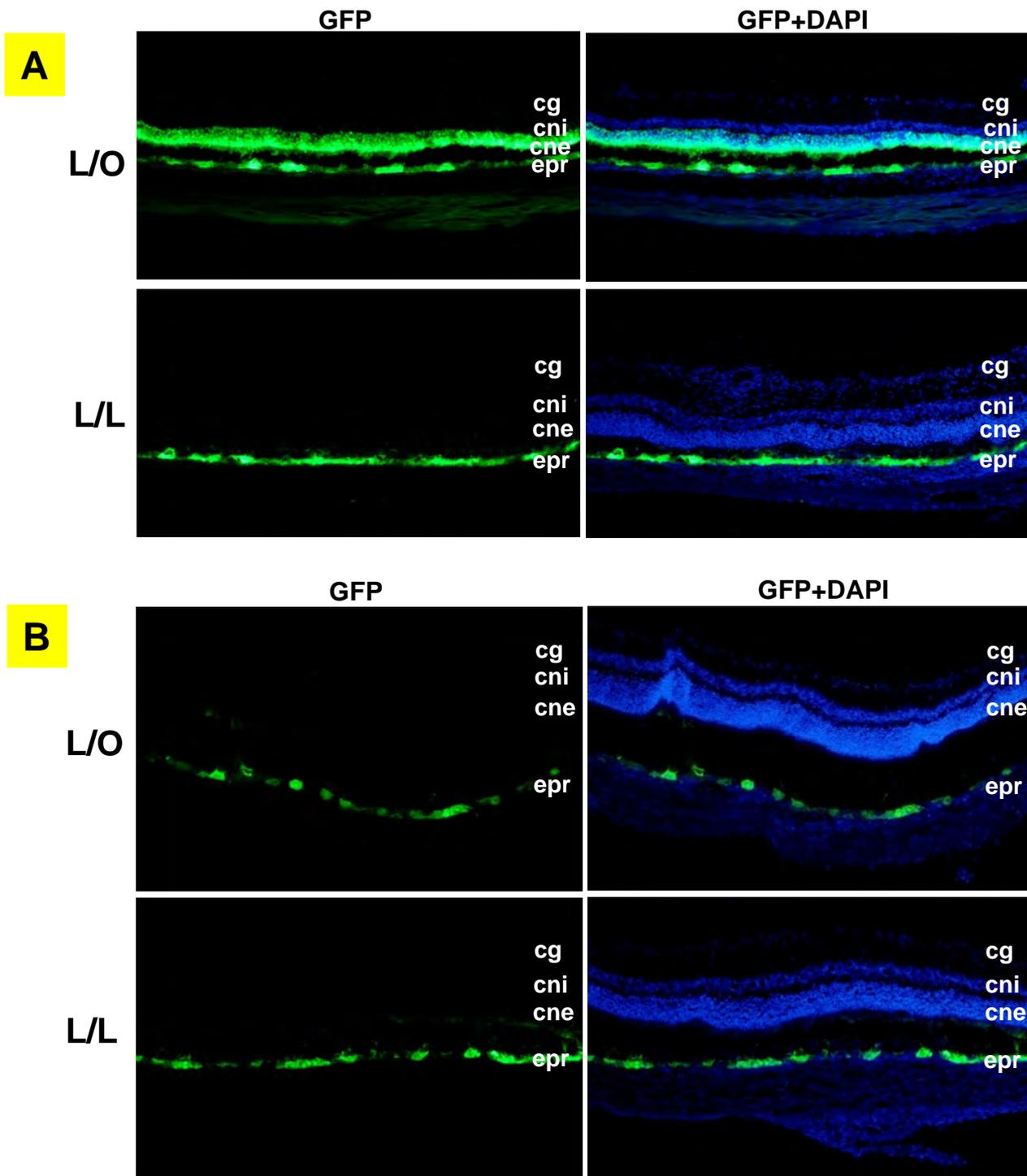


Figure 32. Observation au microscope à fluorescence de coupes transversales de rétine de rats injectés avec les vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP, après exposition aux conditions de lumière L/O ou LL.

Les vecteurs AAV2/4 et AAV2/5.CMV.dGFP ont été injectés en sous-rétinien chez des rats adultes, pour transduire respectivement les cellules de l'EPR seules (*epr*), ou en association avec les photorécepteurs (*cne*). Les rats ont été placés pendant 4 jours consécutifs en condition de lumière L/O ou L/L, avant d'être euthanasiés. Les rétines ont été coupées, puis l'ADN nucléaire a été marqué au DAPI (bleu).

(A) En condition L/O, l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.dGFP est localisée dans les photorécepteurs et l'EPR (*epr*). En condition L/L, l'expression du vecteur AA2/5.CMV.dGFP est localisée uniquement dans l'EPR.

(B) En conditions L/O et L/L, l'expression du vecteur AAV2/4.CMV.dGFP est localisée uniquement dans les cellules de l'EPR.

epr, épithélium pigmentaire rétinien; *cne*, couche nucléaire externe; *cni*, couche nucléaire interne; *cg*, cellules ganglionnaires.

L/O
7J

L/L
2J

L/O
2J

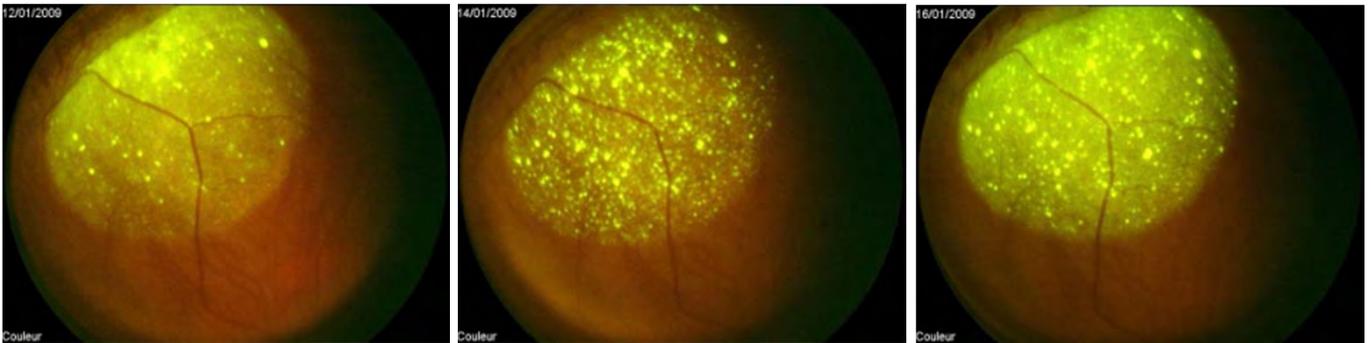


Figure 33. Observation *in vivo* de l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.dGFP dans la rétine, après une exposition courte aux conditions d'éclairage L/O et L/L.

Le vecteur AAV2/5.CMV.dGFP a été administré en sous-rétinien chez un rat adulte pour transduire les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

Les rats injectés ont d'abord été placés en condition d'éclairage cyclique (L/O) pendant 7 jours consécutifs, la photographie en fluorescence du fond d'œil révèle que l'expression de la dGFP est forte dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs. Après 2 jours en condition d'éclairage continu (L/L), le signal fluorescent émis par la dGFP disparaît des photorécepteurs, mais celui-ci est restauré après 2 jours d'exposition en condition L/O. Le signal fluorescent émis par la dGFP dans les cellules de l'EPR reste stable tout au long de cette cinétique.

2.3.2 Évaluation de l'expression dans les photorécepteurs de la dGFP sous le contrôle des promoteurs rhodopsine et rhodopsine kinase, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'exposition prolongée à la lumière induit aussi dans les photorécepteurs, la répression de l'expression du transgène dGFP lorsque celui-ci est sous le contrôle de promoteurs rhodopsine (RHO) ou rhodopsine kinase. Ces 2 promoteurs sont actifs uniquement les photorécepteurs et sont utilisés couramment en transfert de gène dans la rétine (Bennett et al., 1998; Flannery et al., 1997; Khani et al., 2007; Lee et al., 2010; Sun et al., 2010; Zack et al., 1991).

Dans ce but, nous avons administré en sous-rétinien et de façon bilatérale, les vecteurs AAV2/5.RK.dGFP (n=4) et AAV2/5.RHO.dGFP (n=4) chez des rats adultes. L'expression de ces vecteurs dans la rétine se traduit par un signal fluorescent dGFP restreint aux photorécepteurs (**figure 34**) (Khani et al., 2007; Zack et al., 1991).

A 1 mois post-injection, nous avons placé ces rats successivement en condition L/O et L/L, pour des périodes allant jusqu'à 7 jours consécutifs. À la fin de chaque période, nous avons observé et photographié l'expression du transgène dGFP dans les photorécepteurs (**figures 34**) :

- Après 7 jours en condition L/O, le signal fluorescent émis par la dGFP est relativement faible dans les photorécepteurs des rats injectés avec le vecteur AAV2/5.RK.dGFP (**figure 34A**). Tandis que le signal fluorescent est fort dans les photorécepteurs des rats injectés avec le vecteur AAV2/5.RHO.dGFP (**figure 34B**). Aucune variation dans l'intensité ou la topographie du signal dGFP n'a été observée pour ces 2 promoteurs, au cours de la période d'exposition en L/O.
- Après 7 jours en condition L/L, le signal fluorescent émis par la dGFP dans la rétine des rats injectés avec les vecteurs AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP, est respectivement identique à ce qu'ils étaient en condition L/O (**figure 34**). En outre, aucune variation du signal dGFP n'a été observée pour ces 2 promoteurs pendant la période d'exposition L/L, même après 10 jours d'exposition consécutifs à la lumière.
- Le passage successif d'une condition de lumière à l'autre, n'induit aucune variation du signal fluorescent dGFP dans la rétine chez les rats injectés avec ces vecteurs (**figure 34**).

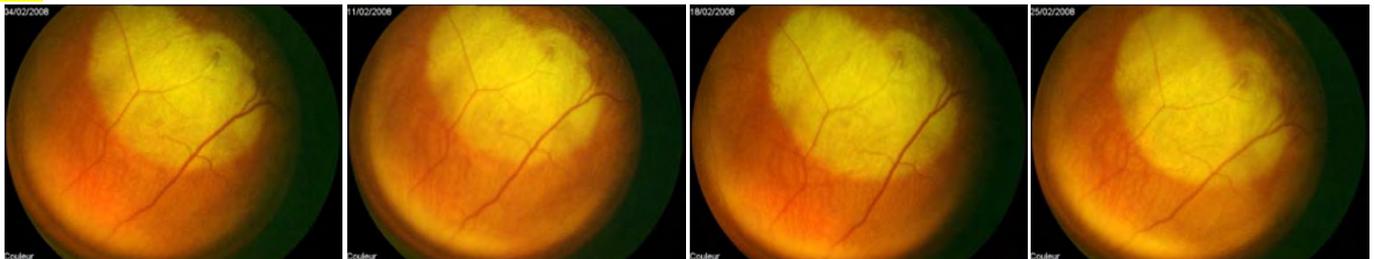
L/O
7J

L/L
7J

L/O
7J

L/L
7J

A



B

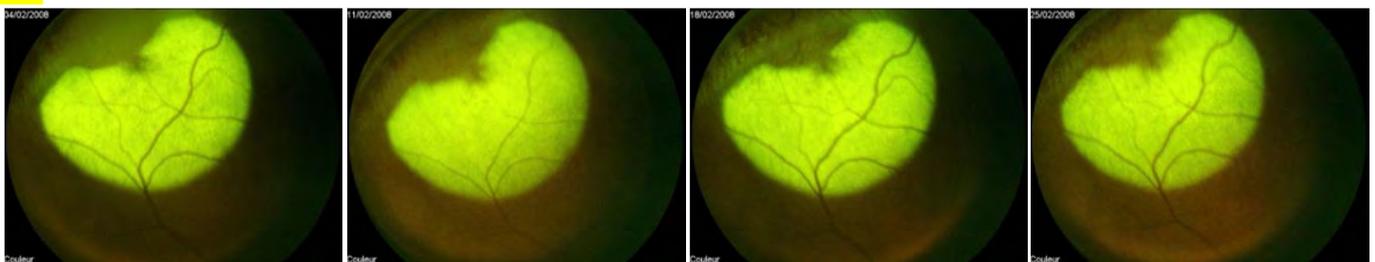


Figure 34. Observation *in vivo* de l'expression des vecteurs AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP dans la rétine de rats après expositions prolongée aux conditions d'éclairage L/O et L/L.

Les vecteurs AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP ont été administrés en sous-rétinien chez des rats adultes. Leur expression est restreinte aux photorécepteurs car le promoteur rhodopsine kinase humain (RK) et le promoteur rhodopsine bovin (RHO) sont des promoteurs spécifiques des photorécepteurs.

A 1 mois post-injection les rats injectés avec ces vecteurs ont été placés successivement dans les conditions de lumières L/O et L/L pendant des périodes de 7 jours consécutifs, puis l'expression de la dGFP dans la rétine a été observée par photographie du fond d'œil en fluorescence.

(A) Expression de la dGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/5.RK.dGFP. En conditions L/O et L/L, l'expression de la dGFP est relativement faible dans les photorécepteurs. L'exposition successive aux conditions de lumière L/O et L/L, n'induit pas de modification du profil d'expression de la dGFP dans la rétine.

(B) Expression de la dGFP dans la rétine d'un rat injecté avec le vecteur AAV2/5.RHO.dGFP. En conditions L/O et L/L, l'expression de la dGFP est relativement forte dans les photorécepteurs. L'exposition alternée aux conditions de lumière L/O et L/L, n'induit pas de modification du profil d'expression de la dGFP dans la rétine.

Ces résultats suggèrent que l'expression du transgène dGFP n'est pas réprimée par la lumière dans les photorécepteurs, lorsque l'expression de la dGFP est dirigée par les promoteurs RHO et RK.

Or les vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP, AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP ne se distinguent entre eux que par leur promoteur, le reste de la cassette d'expression étant strictement identique (**figure 29**).

De ce fait, ces résultats suggèrent que l'effet répresseur de la lumière sur l'expression du transgène dGFP dans les photorécepteurs, est dépendant du promoteur recombinant CMV.

2.3.3. Quantification de la concentration intraoculaire en érythropoïétine en fonction des conditions de lumière L/O et L/L.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons cherché à quantifier l'effet de l'exposition prolongée à la lumière sur l'expression d'un transgène sous le contrôle du promoteur CMV, après transfert de gène dans la rétine.

Dans ce but, nous avons utilisé le vecteur AAV2/5.CMV.EPO exprimant l'érythropoïétine (EPO) sous le contrôle du promoteur CMV. L'EPO présente plusieurs avantages comme gène rapporteur pour cette étude :

- La protéine EPO est stable à la lumière, et permet de faire complètement abstraction du phénomène de bleaching.
- L'expression de l'EPO dans les photorécepteurs et l'EPR, aboutit à sa sécrétion dans les compartiments liquidiens de l'œil, dont la chambre antérieure (Stieger et al., 2006).
- La concentration intraoculaire en EPO ([EPO]) peut être quantifiée de façon répétée par ponction de la chambre antérieure (PCA) et dosage « ELISA ». En outre, cette concentration est directement proportionnelle au niveau d'expression du transgène dans la rétine (Stieger et al., 2006; Stieger et al., 2007).
- Le turn-over de l'EPO dans les compartiments liquidiens de l'œil, est de moins de 3 jours. Ceci permet de corrélérer les variations importantes de l'expression du transgène dans la rétine, avec les variations de concentrations intraoculaires [EPO] mesurées sur des périodes courtes.
- La [EPO] est égale à 0 mUI/mL chez les rats contrôles et ne varie pas entre les conditions de lumière L/O ou L/L.

Nous avons procédé à l'injection sous-rétinienne du vecteur AAV5.CMV-EPOm chez 6 rats (rats AAV5.CMV-EPOm), qui ont été placés en condition L/O jusqu'à 2 mois post-injection. Entre 2 et 6 mois post-injection, ces rats ont été placés successivement en conditions L/O et L/L, pendant des périodes de 7 jours consécutifs (**Figure 35**). À la fin de chaque période de 7 jours, une ponction de la chambre antérieure (PCA) a été réalisée sur tous les rats, et nous avons ensuite quantifié les [EPO] par dosage ELISA :

- Après 7 jours en condition L/O, la [EPO] moyenne (n=6) est comprise entre 311 et 458 mUI/mL (**figure 35**). Les différentes [EPO] moyennes mesurées après chaque condition L/O, ne sont pas significativement différentes entre elles ($p>0,05$). Nous avons utilisé le test de « Student » apparié pour analyser les valeurs [EPO] moyennes.
- Après 7 jours en condition L/L, la [EPO] moyenne est divisée par un facteur 3 ou 4 par rapport à la condition L/O, pour atteindre un niveau basal compris entre 89 et 156 mUI/mL (**figure 35**). Les [EPO] moyennes mesurées après chaque condition L/L ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($p>0,05$).
- Le passage de la condition L/O vers la condition L/L induit systématiquement une diminution de la [EPO] moyenne de l'ordre de 60% à 70%. L'analyse statistique des valeurs de [EPO] moyennes mesurées entre les conditions L/O et en L/L, sont significativement différentes ($p<0,01$) (**figure 35**). Le passage de la condition L/L vers la condition L/O, induit systématiquement la restauration de la [EPO] moyenne.
- L'exposition des rats AAV5.CMV.EPO pendant 14 jours à la condition L/O, n'induit pas de variations significatives de la [EPO] moyenne d'une semaine sur l'autre (**figure 35**). Ceci suggère que les variations de la [EPO] moyenne sont directement dépendantes de l'exposition prolongée à la lumière.

Ces résultats montrent que l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO est inhibée dans la rétine par l'exposition prolongée à la lumière, de façon similaire au vecteur AAV2/5.CMV.dGFP. Ces résultats montrent aussi que l'exposition prolongée à la lumière divise par un facteur 2 ou 3 l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine, par rapport à la condition L/O. De plus, ces résultats indiquent que cet effet inhibiteur est entièrement réversible et reproductible, tout au long de la cinétique qui a duré 4 mois environ. Ceci est d'autant plus intéressant que la plupart des études de transfert de gène dans la rétine chez la souris et le rat sont évaluées dans des conditions de lumière similaires à la condition L/O.

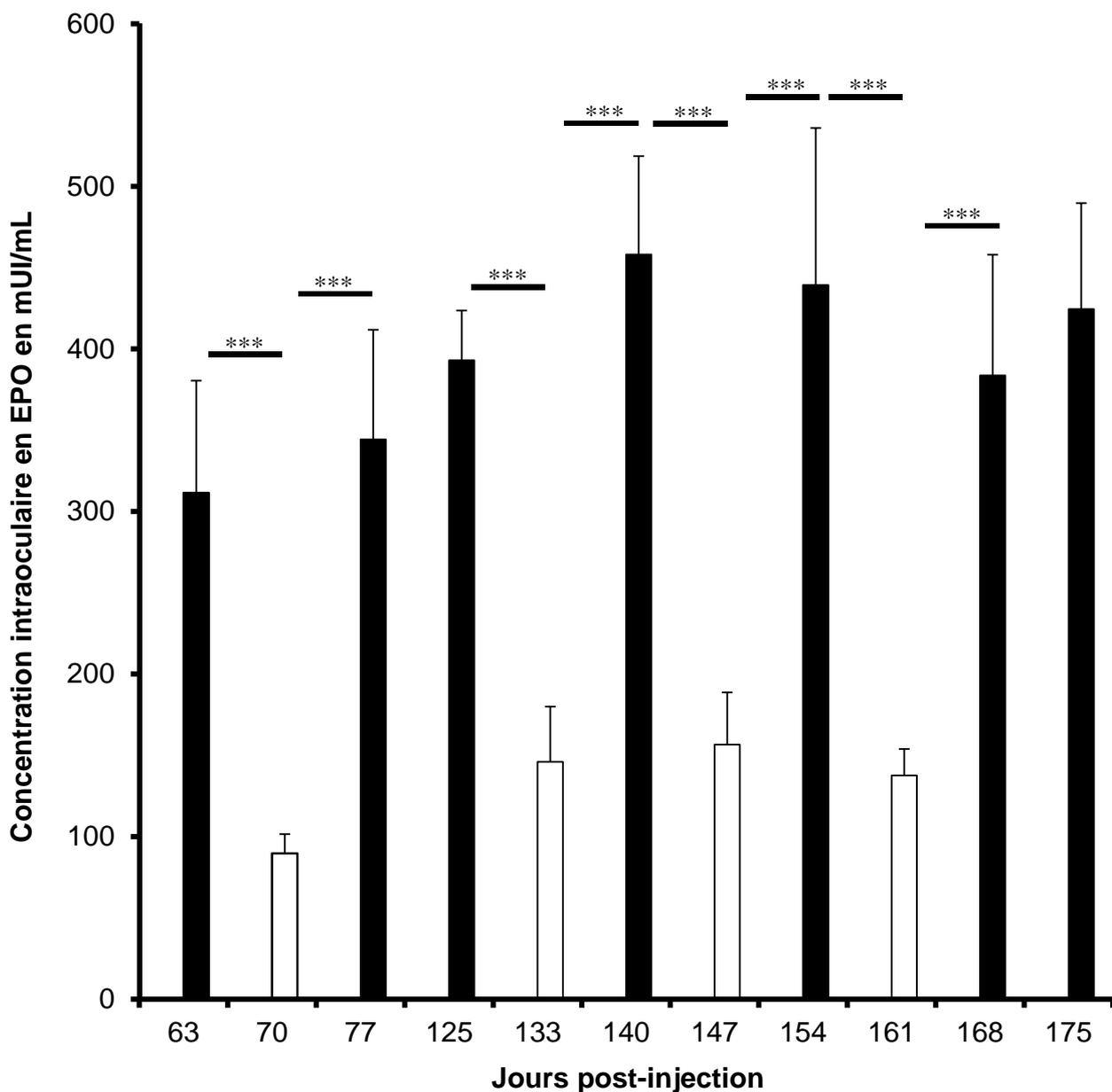


Figure 35. Concentration intraoculaire moyenne en érythropoïétine ([EPO]) chez les rats injectés avec le vecteur AAV2/5.CMV.EPO, en fonction des conditions de lumière L/O et L/L.

Le vecteurs AAV2/5.CMV.EPO a été administré en sous-rétinien chez des rats adulte (n=6).

A 2 mois post-injection, les rats ont d'abord été exposés à la condition de lumière L/O pendant une période de 7 jours consécutifs, à la fin de laquelle une ponction de la chambre antérieure (PCA) à été réalisée sur tous les rats pour quantifier leur [EPO]. Ce premier dosage est représenté par la première barre d'histogramme noire à 63 jours post-injection.

Puis les rats ont été placés successivement en condition de lumière L/L (□ barre d'histogramme blanche) et en condition de lumière L/O (■ barre d'histogramme noire), pendant des périodes de 7 jours consécutifs à la fin desquelles la [EPO] à été quantifiée.

L'exposition des rats à la condition de lumière L/L induit une diminution importante de la concentration intraoculaire en EPO. Cette diminution est réversible en plaçant les rats en conditions L/O.

Les valeurs moyenne des [EPO] ont été calculés pour chaque point de cinétique, ainsi que leur déviation standard. La différence de [EPO] moyenne entre 2 points de cinétique, est considérée comme statistiquement significative pour $p \leq 0.01$ (***), après analyse avec le test de Student.

Sur la base de nos observations réalisées sur le profil d'expression dans la rétine du transgène dGFP dirigé par le promoteur CMV selon les conditions de lumière, nous supposons que les variations de la concentration intraoculaire en EPO entre les conditions L/O et L/L, correspond à un changement du profil d'expression du transgène EPO dans la rétine. En condition L/O, nous supposons que la forte [EPO] correspond à l'expression du transgène à la fois par les cellules de l'EPR et par les photorécepteurs. A l'inverse, en condition L/L, nous supposons que la faible [EPO] correspond à l'expression du transgène uniquement par les cellules de l'EPR.

En conclusion, ces résultats confirment l'effet répresseur de la lumière sur l'expression d'un transgène dans les photorécepteurs, lorsque celui-ci est sous le contrôle du promoteur CMV. Ces résultats permettent aussi d'exclure définitivement le bleaching comme explication de ce phénomène, étant donné que la protéine EPO n'y est pas sensible. Ces résultats montrent aussi que cet effet inhibiteur de la lumière est indépendant du transgène utilisé (dGFP ou EPO) ou du signal de polyadénylation (SV40 polyA ou BGH poly A). Nous proposons donc comme hypothèse que la lumière réprime spécifiquement l'expression des transgènes sous le contrôle du promoteur CMV, et ceci uniquement dans les photorécepteurs. Nous proposons aussi comme hypothèse que ce phénomène passe par l'activation de la cascade de phototransduction qui est spécifique des photorécepteurs.

2.3.4 Évaluation de la toxicité oculaire des agents pharmacologiques ciblant la cascade de phototransduction, et les voies de signalisation associées

Dans la troisième partie de cette l'étude, nous avons cherché à déterminer l'implication de la cascade de phototransduction et des voies de signalisation associées (AMPc/PKA, GMPc/PKG, Acide Rétinoïque) dans l'effet répresseur de la lumière sur les transgènes dirigés par le promoteur CMV dans les photorécepteurs. Ces différentes voies de signalisation sont schématisées dans la **figure 28** : **(1)** la cascade de phototransduction et la voie de signalisation GMPc/PKG (**figure 28A**), **(2)** la voie de signalisation AMPc/PKA (**figure 28B**), et **(3)** la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (**figure 28C**).

Dans ce but, nous avons sélectionné des agents pharmacologiques qui sont des activateurs ou des inhibiteurs spécifiques de la cascade de phototransduction et des voies de signalisation associées. Cependant, avant de pouvoir évaluer leur effet *in vivo* en fonction des conditions de lumière, il était impératif de déterminer leur toxicité et la concentration optimale non toxique qu'il est possible d'injecter *in vivo*.

Les 5 agents pharmacologiques sélectionnés sont :

- Le zaprinast qui permet d'inhiber la cascade de phototransduction et la voie de signalisation GMPc/PKG.

Le zaprinast est un inhibiteur réversible et spécifique de l'enzyme phosphodiésterase 6 (PDE6), qui est une enzyme clé de la cascade de phototransduction (Burns and Arshavsky, 2005; Zhang and Cote, 2005). Plusieurs études ont montré que l'administration de zaprinast sur des explants de rétine de rat exposés à la lumière, induit l'arrêt de la cascade de phototransduction, et l'augmentation de la sécrétion de glutamate au niveau de la synapse des photorécepteurs (Barabas et al., 2004; Paquet-Durand et al., 2009).

- Le CPT-cAMP et le RP-cAMP qui permettent respectivement d'activer et d'inhiber la voie de signalisation AMPc/PKA (Fukuhara, 2004).

Le CPT-cAMP est un activateur compétitif et réversible des différents facteurs cellulaires activés par l'AMPc endogène, dont la kinase PKA (Sen and Campochiaro, 1991; Shen et al., 1999). Le RP-cAMP est un inhibiteur compétitif et réversible des mêmes facteurs cellulaires que ceux activés par l'AMPc (Aragona and Wang, 2007; Cancedda et al., 2003).

- Le all-trans-rétinal (ATRA) et le RO 41-5253 qui permettent respectivement d'activer et d'inhiber la voie de signalisation de l'acide rétinoïque.

L'ATRA est une molécule identique à la forme endogène produite dans les photorécepteurs. L'ATRA possède aussi la capacité d'activer les récepteurs à l'acide rétinoïque (Chambon, 1996). Le RO 41-5253 est un antagoniste réversible et compétitif de l'ATRA pour les récepteurs à l'acide rétinoïque (Schapira et al., 2000).

Puis, nous avons déterminé la toxicité oculaire de chaque agent pharmacologique. Dans ce but, nous avons défini pour chaque agent pharmacologique, 3 doses croissantes à administrer *in vivo*, sur la base d'une étude bibliographique extensive. Les différentes doses et concentrations évaluées sont présentées dans le **tableau 1**. Tous les agents pharmacologiques ont été administrés par voie sous-rétinienne dans un volume de 5µL de tampon, à l'exception de l'ATRA qui a été administré par voie intramusculaire dans un volume de 500µL de tampon. Nous avons ensuite surveillé par examen du fond d'œil l'apparition éventuelle d'effets toxiques tels qu'une inflammation locale, une décoloration de la rétine, une nécrose ou encore un détachement de la neurorétine.

- L'administration sous-rétinienne de zaprinast n'induit pas d'effet délétère sur la rétine, même à la concentration la plus élevée testée : 10mM.

- L'administration sous-rétinienne du CPT-cAMP induit une dilatation transitoire des vaisseaux intra-rétiniens lorsqu'il est injecté à la concentration maximale (5mM), mais pas aux concentrations plus faibles 1mM et 100µM.
- L'administration sous-rétinienne de RP-cAMP n'induit pas d'effet délétère sur la rétine, même à la concentration la plus élevée testée : 20mM.
- L'administration intramusculaire de l'ATRA n'induit pas d'effet délétère sur la rétine, même à la concentration la plus élevée testée : 10mM.
- L'administration sous-rétinienne de RO 41-5253 n'induit pas d'effet délétère sur la rétine, même à la concentration la plus élevée testée : 1mM.

Nous avons donc sélectionné les concentrations maximales non toxiques, comme étant optimale pour être administrées *in vivo*. Ces concentrations sont surlignées en rouge dans le **tableau 1** : 10mM pour le zaprinast, 1mM pour le CPT-cAMP, 20mM pour le RP-cAMP, 10mM pour l'ATRA, et enfin 1mM pour RO 41-5253.

2.3.5 Évaluation de l'effet de l'administration intraoculaire de zaprinast sur l'effet répressur de la lumière dans la rétine

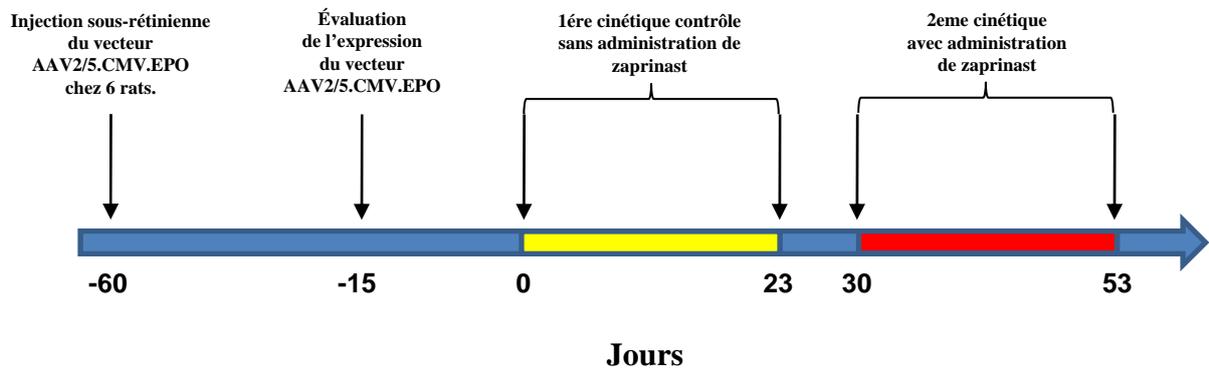
Nous avons ensuite cherché à déterminer si le blocage de la cascade de phototransduction par l'administration intraoculaire de zaprinast, permet de lever l'inhibition induite par l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine.

Dans ce but, nous avons injecté le vecteur AAV5.CMV.EPO chez un groupe de 6 rats en sous-rétinien, puis nous avons confirmé l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine par PCA et dosage de la [EPO] à 1,5 mois post-injection (**figure 36A**) (résultats non montrés).

A 2 mois post-injection, nous avons réalisé quantifier l'expression du transgène EPO dans la rétine en fonction des conditions de lumière au cours de 2 cinétiques : la première a été réalisée sans administration intraoculaire de zaprinast (**figure 36B**) tandis que la seconde a été réalisée avec administration intraoculaire de 50nmoles de Zaprinast (**figure 36C**).

A

Chronologie de l'expérience visant à déterminer l'effet du zaprinast *in vivo* sur l'effet répresseur de la lumière dans la rétine des rats AAV2/5.CMV.EPO

**B**

1ère cinétique contrôle sans administration de zaprinast

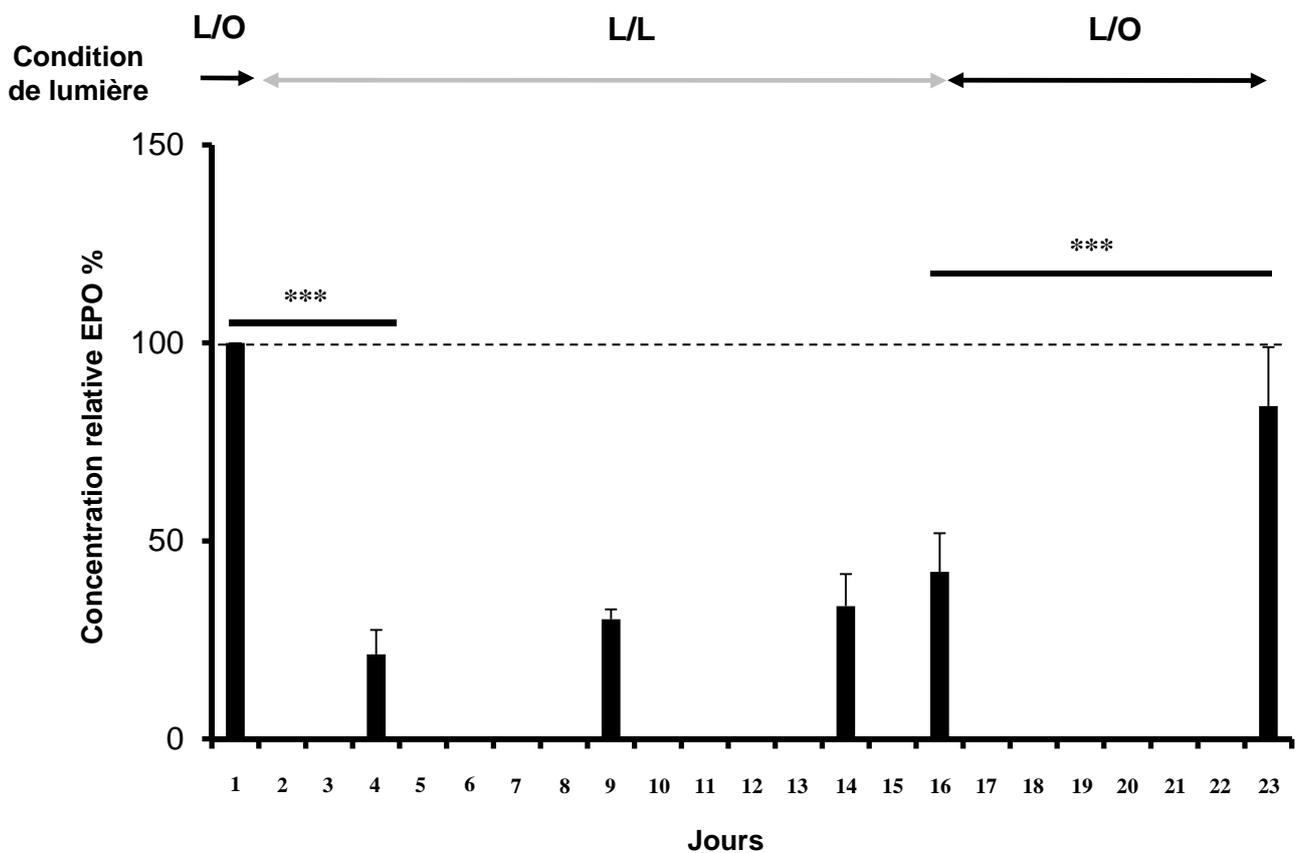


Figure 36 (début). L'administration intraoculaire de zaprinast restaure l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine, en condition de lumière L/L.

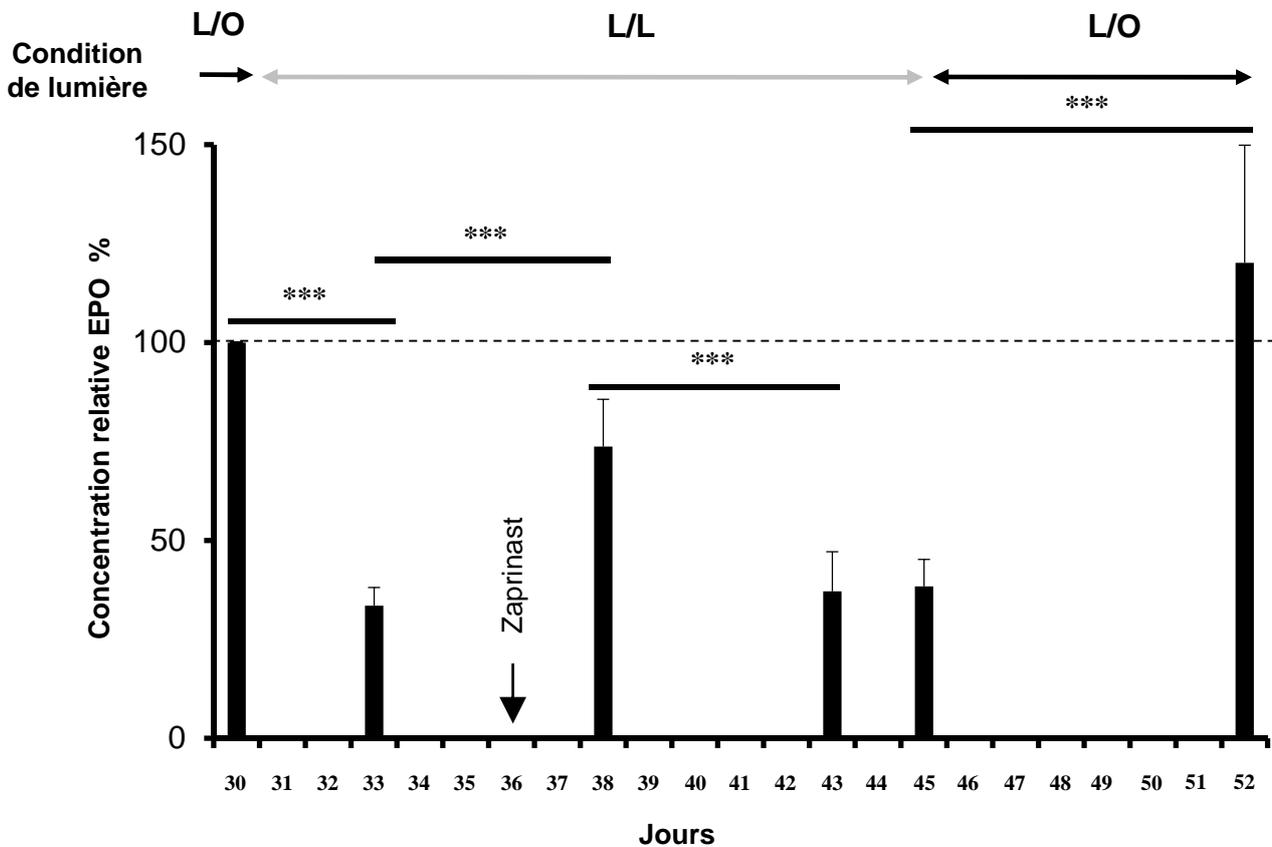
C**2eme cinétique avec administration de zaprinast**

Figure 36 (fin). L'administration intraoculaire de zaprinast restaure l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine, en condition de lumière L/L.

(A) Représentation schématique de la chronologie de l'expérience. 6 rats ont été injectés en sous-rétinien avec le vecteur AAV2/5.CMV.EPO. A 1,5 mois post-injection, l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine des rats, a été vérifiée par ponction de la chambre antérieure (PCA) de l'œil et dosage ELISA de la concentration intraoculaire en EPO ([EPO]). 15 jours plus tard, nous avons commencé la cinétique contrôle sans administration de zaprinast, qui a été suivie de la cinétique avec administration intraoculaire de zaprinast.

(B) Cinétique contrôle sans administration de zaprinast. Les rats ont été placés en condition L/O jusqu'au jour 1 de la cinétique, puis placés en condition L/L entre le jour 2 et 16, puis à nouveau en condition L/O entre le jour 17 et 23. Une PCA et un dosage de [EPO] ont été réalisés aux jours 1, 4, 9, 14, 16, et 23.

(C) Cinétique avec administration de zaprinast. Les rats ont été placés successivement dans les conditions de lumière L/O et L/L de façon identique à la 1ère cinétique contrôle. Cependant au jour 36 de la cinétique, les rats ont reçu une administration intraoculaire de 50 nmoles de zaprinast. De la même façon, une série de PCA et un dosage de [EPO] ont été réalisés aux jours 30, 33, 38, 43, 45 et 52.

Les valeurs moyennes des [EPO] ont été calculées pour chaque point de cinétique et normalisées par rapport à la valeur moyenne du premier jour de chaque cinétique (100%). Les déviations standard ont été calculées. La différence de [EPO] moyenne entre 2 points de cinétique, est considérée comme statistiquement significative pour $p \leq 0.01$ (***), après analyse avec le test de Student.

La première cinétique contrôle a pour but de quantifier la concentration intraoculaire [EPO] chez les rats AAV2/5.CMV.EPO, uniquement en fonction des conditions de lumière L/O et L/L (**figure 36B**). D'abord, les rats ont été placés en condition L/O, 7 jours avant le début de la cinétique. Au 1^{er} jour de la cinétique (J1), la [EPO] moyenne a été dosée et normalisée à 100%. Entre J2 et J16, les rats ont été placés en condition L/L, ce qui a induit une diminution de la [EPO] moyenne entre 22 et 41% de la [EPO] moyenne initiale. À partir de J16, les rats ont été placés de nouveau en condition L/O, ce qui a restauré la [EPO] à J23, à son niveau initial ($84\pm 15\%$) (**figure 36B**).

La deuxième cinétique est similaire à la première cinétique, mais elle a pour but de déterminer l'effet de l'administration sous-rétinienne de zaprinast sur la [EPO] moyenne en condition L/L. Pour cela nous avons administré 50 nmoles de zaprinast (10mM, 5 μ L) en sous-rétinien chez ces rats AAV2/5.CMV.EPO à J36, soit 6 jours après le début de la condition L/L (**figure 36C**). De la même façon, les rats ont été placés en condition L/O, 7 jours avant le début de la deuxième cinétique. À J30 nous avons dosé la [EPO] moyenne, puis nous l'avons normalisée à 100%. Entre J31 et J45, les rats ont été placés en condition L/L, ce qui induit à J33 la diminution de la [EPO] moyenne à 33% du niveau initial. Cependant, l'administration du zaprinast à J36, induit une augmentation de la [EPO] moyenne à J38, qui atteint alors 74% du niveau initial. L'administration intraoculaire induit donc une augmentation de la [EPO] de + 124% à 48 heures post-injection. À J43 et J45, la [EPO] moyenne revient à son niveau basal à environ 37% du niveau initial. À partir de J45, rats ont été placés à nouveau en condition L/O, ce qui a restauré la [EPO] à son niveau initial ($120\pm 30\%$).

En outre, nous avons vérifié que l'administration sous-rétinienne de 5 μ L d'une solution tampon sans zaprinast, n'induit pas d'augmentation de la [EPO].

Ces résultats montrent que l'administration intraoculaire de zaprinast permet d'augmenter spécifiquement l'expression basale du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine en condition L/L. De ce fait, ces résultats suggèrent que le blocage de la cascade de phototransduction, permet de lever l'effet inhibiteur induit par l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans les photorécepteurs. Nous proposons donc que l'effet inhibiteur de la lumière sur l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO passe par l'activation de la cascade de phototransduction.

Afin de déterminer précisément le ou les voie(s) de signalisation impliquée(s) dans la régulation de l'expression des transgènes EPO dans les photorécepteurs, lorsque ceux-ci sont dirigés par le promoteur CMV, il aurait été nécessaire d'évaluer *in vivo* l'effet des autres agents pharmacologiques en fonction des conditions de lumière.

Faute de temps, nous n'avons pas pu évaluer au cours de la durée ma thèse, les 4 autres agents pharmacologiques restants. Pour la même raison, nous n'avons pas pu quantifier le niveau des ARNm recombinants exprimés dans la rétine, en fonction des conditions de lumières L/O et L/L.

2.4 DISCUSSION

2.4.1 Résumé des résultats expérimentaux

Dans cette étude, nous avons montré que l'exposition prolongée à une lumière d'intensité modérée (300-400 Lux), induit la répression dans la rétine, et plus précisément dans les photorécepteurs, de l'expression des transgènes dGFP et EPO lorsque ceux-ci sont dirigés par le promoteur CMV. Ce phénomène a lieu dans les 24 à 48 heures qui suivent l'exposition continue à la lumière, et se traduit par la répression continue de l'expression de ces transgènes pendant toute la durée de l'exposition à la lumière. A l'inverse, l'exposition prolongée à la lumière n'a pas d'effet inhibiteur sur l'expression de ces transgènes dans les cellules de l'EPR.

En outre, nous avons montré que l'effet inhibiteur de la lumière sur l'expression de ces transgènes, est indépendant du transgène (dGFP ou EPO) ou de la séquence polyA inclus dans la cassette d'expression. Nous avons montré aussi que cet effet inhibiteur affecte uniquement l'expression de la dGFP lorsque celui-ci est dirigé par le promoteur recombinant CMV, et pas lorsqu'il est dirigé par d'autres promoteurs (promoteurs RHO et RK).

Finalement, nous avons montré que l'administration intraoculaire d'un inhibiteur de la cascade de phototransduction, le zaprinast, permet de lever l'effet inhibiteur de la lumière dans la rétine sur l'expression du transgène EPO sous le contrôle du promoteur CMV.

Ces observations réalisées *in vivo* ont été rendues possible par l'utilisation des gènes rapporteurs dGFP et EPO, dont la demi-vie est courte avec 2 heures pour la dGFP, et moins de 3 jours pour l'EPO. Ces deux gènes rapporteurs nous ont permis de suivre quasiment en temps réel les variations d'activité de ces différentes cassettes d'expression dans la rétine.

2.4.2 Discussion relative aux mécanismes cellulaires potentiellement responsables de l'effet répresseur de la lumière dans les photorécepteurs.

Afin d'expliquer ce phénomène d'inhibition par la lumière, nous sommes amené à nous poser 2 questions. La première consiste à déterminer si ce phénomène d'inhibition induit uniquement dans les photorécepteurs, est de type « cell-autonomous » ou non, c'est-à-dire si les variations d'expression des transgènes sont indépendantes ou non des autres types cellulaires présents dans la

rétine. La seconde question consiste à savoir si l'inhibition de l'expression des transgènes sous le contrôle du promoteur CMV, a lieu au niveau transcriptionnel (promoteur CMV), ou au niveau post-transcriptionnel (ARNm et protéine recombinante).

Pour déterminer si l'effet inhibiteur de la lumière dans les photorécepteurs est de type « cell-autonomous » ou non, il serait intéressant de vérifier *in vitro* sur culture primaire de photorécepteurs, s'il est possible de reproduire la répression des vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.EPO, par une exposition prolongée à la lumière. Malheureusement, les cultures primaires de photorécepteurs sont difficiles à réaliser, et nous ne disposons pas de cette technique actuellement dans notre laboratoire (Romano and Hicks, 2007).

Cependant, nous avons pu montrer au cours de cette étude que l'effet inhibiteur de la lumière semble passer par l'activation de la cascade de phototransduction dans les photorécepteurs. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'enzyme PDE6 par le zaprinast, permet de lever en grande partie la répression induite par l'exposition prolongée à la lumière sur l'expression du transgène EPO dans la rétine. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que l'expression du transgène dGFP n'est pas inhibée par la lumière dans les cellules de l'EPR, qui ne sont pas des cellules photosensibles.

Toutefois, afin de déterminer de façon rigoureuse et définitive l'implication de la cascade de phototransduction dans ce phénomène, il serait nécessaire de vérifier pharmacologiquement, que l'activation de la cascade de phototransduction en condition L/O permet de réprimer l'expression dans les photorécepteurs des transgènes dGFP et EPO, lorsque ceux-ci sont sous le contrôle du promoteur CMV. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé d'agent pharmacologique permettant d'activer de façon spécifique, efficace et réversible la cascade de phototransduction.

De plus, au cours de cette étude, nous avons aussi souhaité déterminer l'implication des voies de signalisation associées à la cascade de phototransduction (AMPc/PKA, GMPc/PKG et voie de signalisation de l'acide rétinoïque). Dans ce but, nous avons sélectionné et évalué la toxicité de plusieurs agents pharmacologiques spécifiques et réversibles. Cependant, faute de temps, nous n'avons pu évaluer *in vivo* que l'effet du zaprinast sur l'expression du vecteur AAV2/5.CMV.EPO dans la rétine en condition L/L.

Quant à savoir à quel niveau a lieu l'inhibition de l'expression de ces transgènes, au niveau transcriptionnel ou au niveau post-transcriptionnel, Il semble très probable que l'effet de la lumière porte soit sur l'activation du promoteur CMV, soit sur la stabilité des ARNm ou leur traduction :

➤ En effet, nous avons montré au cours de notre étude que parmi les 3 vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP, AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP, seul le vecteur sous le

contrôle du promoteur CMV est inhibé, alors qu'ils expriment tous les 3 la même protéine recombinante dGFP. Donc, il semble peu probable que la lumière inhibe l'expression de la dGFP en dégradant spécifiquement la protéine dGFP produite par le vecteur AAV2/5.CMV.dGFP, et pas la protéine dGFP identique produite par les vecteurs AAV2/5.RK.dGFP et AAV2/5.RHO.dGFP. De ce fait, nous pouvons supposer que l'exposition prolongée à la lumière module l'activité du promoteur CMV, ou la stabilité des ARNm ou leur traduction.

- Dans l'hypothèse où cet effet inhibiteur aurait lieu au niveau transcriptionnel, nous proposons un modèle de régulation de l'activité du promoteur CMV dans les photorécepteurs par la lumière et l'obscurité (**figure 37**).

Nous proposons l'hypothèse que l'activation et l'inactivation de la cascade de phototransduction induisent respectivement, l'inactivation et l'activation des voies de signalisation AMPc/PKA et GMPc/PKG dans les photorécepteurs, et par extension l'activation des facteurs de transcription activateurs CREB et ATF qui activeraient à leur tour le promoteur CMV.

En effet, le promoteur recombinant CMV présente dans sa séquence, 4 sites « cAMP Response Element » (CRE) capables de recruter les facteurs de transcription CREB et ATF (Mayr and Montminy, 2001). Ces facteurs de transcription activateurs, CREB et ATF, sont présents de façon ubiquitaire dans l'organisme. Or, l'activation de ces FT a été décrite comme étant induite par de nombreuses voies de signalisation cellulaire dont les voies GMPc/PKG et surtout AMPc/PKA (Johannessen et al., 2004; Mayr and Montminy, 2001; Pilz and Casteel, 2003).

Dans les photorécepteurs, ces mêmes voies de signalisation ont été décrites comme étant régulées par la cascade de phototransduction (Burns and Arshavsky, 2005). À l'obscurité, la concentration intracellulaire en GMPc est élevée dans les photorécepteurs, induisant l'activation de la voie de signalisation GMPc/PKG (Paquet-Durand et al., 2009; Zhang and Cote, 2005). En outre, à l'obscurité, les canaux ioniques Ca²⁺/Na⁺ dépendant du GMPc, sont activés par la concentration élevée du GMPc dans les photorécepteurs. Ceci a pour conséquences : **(1)** l'entrée dans les photorécepteurs de Ca²⁺, **(2)** l'activation de l'adénylate cyclase 1 qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc, et **(3)** l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA (Jackson et al., 2009; Willardson et al., 1996). A la lumière, l'activation de la cascade de phototransduction aboutit à l'activation de PDE6 qui lyse le GMPc, et induit une diminution des concentrations intracellulaires en Ca²⁺ et en AMPc (Burns and Arshavsky, 2005; Farber et al., 1981; Jackson et al., 2009; Orr et al., 1976). Ceci a pour conséquences, d'une part l'inhibition de la voie de signalisation GMPc/PKG, et d'autre part l'inhibition de la voie de signalisation AMPc/PKA/CREB-ATF.

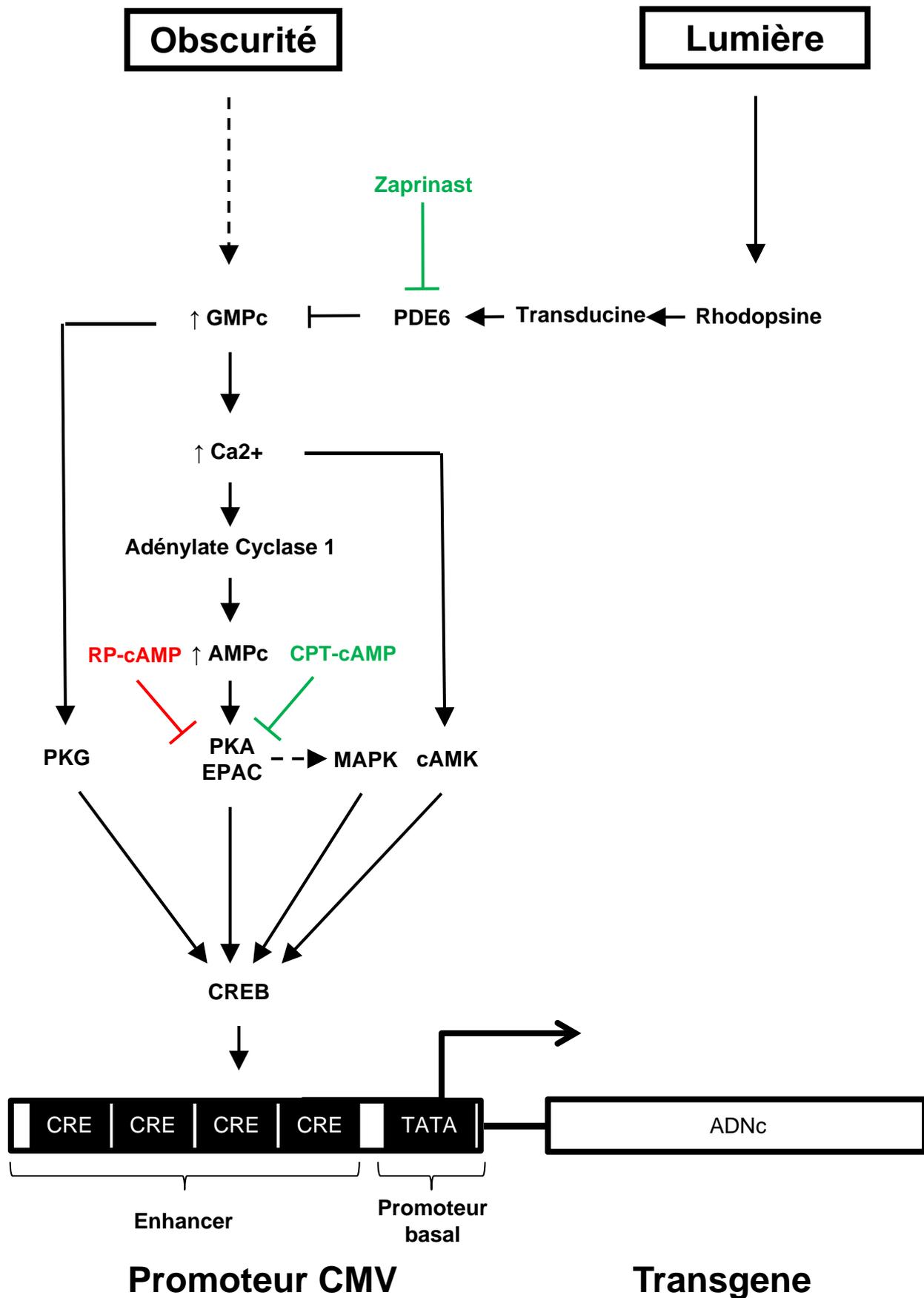


Figure 37. Proposition d'un mécanisme de régulation transcriptionnelle du promoteur CMV, par la lumière et par l'obscurité dans les photorécepteurs.
 Voir la partie discussion pour le détail de ce mécanisme.

Ainsi, nous supposons que le promoteur CMV est activé à l'obscurité, mais inactivé par la lumière, *via* l'activation et l'inactivation des voies de signalisation GMPc/PKG et AMPc/PKA.

En outre, ce modèle est cohérent avec le fait que les promoteurs rhodopsine et rhodopsine kinase, qui ne sont pas inhibés par l'exposition prolongée à la lumière, ne présentent pas de motifs CRE dans leur séquence.

Afin de déterminer si cette hypothèse est correcte, il serait nécessaire de réaliser une cinétique de quantification par RT-QPCR du niveau des ARNm recombinants exprimés dans les photorécepteurs par les vecteurs AAV2/5.CMV.dGFP et AAV2/5.CMV.EPO, en conditions L/O et L/L.

Nous avons récemment conduit une première série d'expériences préliminaires, pour mettre au point cette expérience. Cependant, nous sommes confrontés à 2 problèmes majeurs, qui nous ont empêchés d'aboutir à un protocole expérimental rigoureux pour quantifier les ARNm recombinants :

- Le premier problème correspond à la difficulté de trouver des gènes endogènes, dont l'expression est stable entre ces 2 conditions de lumière, et qui puissent servir à normaliser l'expression des ARNm recombinants entre les rats des différents groupes expérimentaux en L/O et L/L.
- Le second problème a pour cause l'hétérogénéité, parfois importante, du niveau d'expression d'un transgène pour une condition de lumière donnée, entre les différents rats injectés avec le même vecteur. De ce fait, afin de pouvoir conduire une analyse statistique comparative entre les différents groupes de rats, il faut soit homogénéiser autant que possible le niveau d'expression initial de tous les rats, soit constituer des groupes de rats avec un grand nombre d'animaux ($n \geq 20$) pour pouvoir faire abstraction dans les tests statistiques (Student non apparié) de cette hétérogénéité intra-groupes.

2.4.3 Discussion au sujet des conséquences potentielles de ce phénomène sur la thérapie génique dans l'œil

Le promoteur CMV a été très largement utilisé en transfert de gène dans la rétine, que ce soit pour y faire exprimer un gène rapporteur, pour évaluer le tropisme d'un vecteur viral, ou pour évaluer les bénéfices d'un transgène thérapeutique (Ali et al., 1996; Allocca et al., 2007; Lau et al., 2000; Tan et al., 2009; Weber et al., 2003; Yang et al., 2002). On peut dès lors, se demander si le choix du promoteur CMV pour diriger l'expression de ces différents transgènes, aurait pu être

défavorable à leur expression dans la rétine, et donc à l'évaluation voire au succès de certaines stratégies thérapeutiques. La question se pose particulièrement dans les contextes expérimentaux supposant une exposition prolongée à la lumière des animaux traités, ou dans le contexte de l'activation continue ou anormale de la cascade de phototransduction. Deux études, Lau et coll. 2000 et Tan et coll., nous ont semblées illustrer particulièrement bien cette problématique (Lau et al., 2000; Tan et al., 2009).

Lau et coll. ont évalué l'effet thérapeutique du facteur neurotrophique, Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2), pour prévenir la dégénérescence rétinienne induite par l'exposition prolongée à une source de lumière intense (Lau and Flannery, 2003; Lau et al., 2000; Noell et al., 1966).

En effet, Noell et coll. ont montré que l'exposition de rats à une lumière blanche de forte intensité (2 000 Lux) et pendant une période de 7 jours consécutifs, induit la dégénérescence de la rétine avec une diminution du nombre de photorécepteurs suite à leur apoptose (Noell et al., 1966; Yu et al., 2007). En outre, Faktorovich et coll. ont montré que l'administration intra-vitréenne de la protéine recombinante FGF2 chez des rats, avant leur exposition prolongée à une lumière intense (7-14 jours, 2000 Lux), permet de préserver histologiquement la rétine et d'empêcher l'apoptose des photorécepteurs (Faktorovich et al., 1992).

Ainsi, Lau et coll. ont évalué l'effet thérapeutique de l'injection sous-rétinienne d'un vecteur ssAAV2 codant pour FGF2 sous le contrôle du promoteur CMV, pour prévenir la dégénérescence induite par une exposition prolongée à une lumière intense (7 jours, 1300 Lux). Les auteurs ont montré que le traitement des rats avec ce vecteur ne permet de prévenir ni la dégénérescence de la rétine et l'apoptose des photorécepteurs, ni l'altération de l'activité électrophysiologique de la rétine mesurée par ERG (Lau and Flannery, 2003; Lau et al., 2000).

On peut s'interroger sur la différence d'efficacité thérapeutique entre la stratégie d'injection intraoculaire de la protéine FGF2 de Faktorovich et coll., et la stratégie d'expression *in situ* de FGF2 dans la rétine de Lau et coll.

L'hypothèse la plus évidente serait la différence dans la méthode d'administration du FGF2 dans l'œil. Faktorovich et coll. ont injecté dans l'œil la protéine FGF2 active biologiquement, tandis que Lau et coll. ont injecté dans la rétine un vecteur exprimant le transgène FGF2 bien que l'efficacité biologique la protéine FGF2 exprimée par ce vecteur n'ait pas été prouvée au préalable.

Une autre hypothèse découle directement des résultats de notre étude, et du fait que Lau et coll. aient utilisé un vecteur ssAAV2 exprimant FGF2 sous le contrôle du même promoteur CMV que nous avons utilisé dans notre étude, pour transduire les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. On peut

conjecturer que l'expression de FGF2 dans la rétine des rats traités avec ce vecteur est maximum en condition d'éclairage cyclique, mais que pendant la période d'exposition à une lumière prolongée et intense, l'expression de FGF2 a été réprimée fortement. De ce fait, on peut supposer que FGF2 n'était pas exprimé à un niveau suffisant pour permettre un effet thérapeutique et préventif contre la dégénérescence rétinienne induite par 7 jours consécutifs de lumière intense. Dans ce contexte, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique du transfert de gène FGF2 dans la rétine semble difficile à évaluer correctement.

Plus récemment, Tan et coll. ont évalué l'efficacité d'un protocole de thérapie génique de complémentation dans différents modèles murins porteurs de mutations dans le gène « Aryl hydrocarbon receptor interacting like protein 1 » (AIPL1) (Tan et al., 2009). AIPL1 est une protéine chaperonne exprimée dans la rétine spécifiquement dans les photorécepteurs. Celle-ci est nécessaire à la biosynthèse de l'enzyme PDE6, qui est un facteur clé de la cascade de phototransduction. Les mutations du gène AIPL1 induisent un déficit de l'enzyme PDE6 dans les photorécepteurs, une forte diminution de l'activité électrophysiologique de la rétine, ainsi que la dégénérescence des photorécepteurs puis du reste de la rétine.

Dans l'étude de Tan et coll., un vecteur ssAAV2 codant pour AIPL1 sous le contrôle du promoteur CMV, a été injecté en sous-rétinien chez des souris mutantes pour AIPL1. Les auteurs ont évalué l'efficacité thérapeutique de leur vecteur dans 2 conditions de lumière. La première condition de lumière correspond à un éclairage cyclique des souris (12h lumière : 12h obscurité), la seconde condition de lumière correspond à un éclairage continu des souris traitées pendant 7 jours consécutifs.

Les auteurs ont observé une restauration partielle de la fonction électrique de la rétine, ainsi que la préservation des photorécepteurs lorsque les souris traitées sont placées en condition d'éclairage cyclique. A l'inverse, en condition d'éclairage continu, le traitement des souris par le vecteur thérapeutique ssAAV2 n'induit aucune préservation histologique ou fonctionnelle de la rétine.

On peut donc conjecturer que l'exposition prolongée à la lumière, même peu intense, a pu induire une diminution significative de l'expression du transgène AIPL1 sous le contrôle du promoteur CMV, et donc limiter le bénéfice thérapeutique de cette approche en condition d'exposition prolongée à la lumière.

À ce jour, Le promoteur CMV n'a jamais été utilisé en clinique humaine pour réaliser un transfert de gène thérapeutique dans les photorécepteurs. Cependant, le groupe du Dr. Elizabeth P. Rakoczy prépare actuellement un essai clinique qui vise à traiter des patients atteints de néo-vascularisation rétinienne, en leur administrant en sous-rétinien le vecteur rAAV.sFlt-1 de sérotype 2. Ce vecteur exprime le transgène sFlt-1 sous le contrôle du promoteur CMV, et son administration sous-rétinienne aboutit à la transduction des cellules de l'EPR et des photorécepteurs chez la souris (Lai et al., 2009). Le transgène sFlt-1 code pour un anticorps recombinant qui est dirigé contre le facteur soluble VEGF (facteur de croissance dérivé des cellules endothéliales vasculaires). En effet, les patients atteints de néo-vascularisation rétinienne sur-expriment le facteur angiogénique VEGF, ce qui conduit à une prolifération vasculaire qui est délétère pour la rétine. Le groupe du Dr. Elizabeth P. Rakoczy a montré expérimentalement l'efficacité et l'innocuité de ce vecteur chez la souris (Lai et al., 2009). Cependant, cette étude a été réalisée dans les conditions environnementales d'une animalerie souris proche de notre condition L/O. On peut se demander si ce vecteur aura la même efficacité thérapeutique chez les patients humains, sachant qu'ils évoluent dans un environnement très différent de celui d'une animalerie.

2.4.4 Discussion relative à d'autres facteurs pouvant influencer négativement l'expression d'un transgène dans les photorécepteurs.

Notre étude a mis en évidence l'effet répressur de la lumière sur l'expression d'un transgène dans les photorécepteurs lorsque celui-ci est sous le contrôle d'un promoteur CMV. On peut aussi imaginer que d'autres facteurs, d'ordre génétique physiologique ou encore pharmacologique, puissent aussi avoir un impact négatif sur l'expression dans les photorécepteurs de vecteurs sous le contrôle d'un promoteur CMV ou d'un autre promoteur :

- Parmi les facteurs génétiques potentiellement défavorables à l'expression des transgènes dans les photorécepteurs, on peut imaginer que les mutations génétiques qui affectent la cascade de phototransduction et qui induiraient soit son activation prolongée soit une altération de son inactivation, pourraient avoir un effet défavorable sur l'expression des transgènes dans les photorécepteurs, lorsque ceux-ci sont sous le contrôle du promoteur CMV. Par exemple, certaines mutations du gène rhodopsine induisent une activation continue de la cascade de phototransduction et ceci même en l'absence de lumière (Hartong et al., 2006; Wilson and Wensel, 2003). Dans ce contexte génétique, l'activation constante de la cascade de phototransduction pourrait avoir les mêmes conséquences sur l'expression des transgènes thérapeutiques ou non sous le contrôle du promoteur CMV, que l'exposition prolongée à la lumière. De ce fait, le choix du promoteur CMV ne semble pas optimal pour diriger l'expression d'un transgène thérapeutique dans les photorécepteurs des sujets porteurs de ces mutations.

En outre, il est intéressant de noter qu'aucune étude publiée à ce jour n'a évalué l'influence d'un contexte cellulaire pathologique sur l'efficacité du transfert de gène dans la rétine, par rapport à un contexte cellulaire physiologique normal.

- Parmi les facteurs physiologiques potentiellement défavorables à l'expression de ces vecteurs, on pourrait aussi citer l'expression dynamique des micro-ARN interférentiels (miRNA) dans la rétine qui sont impliqués dans de nombreux processus développementaux et physiologiques dans l'œil et la rétine (Shi et al., 2009; Xu, 2009).

Krol et coll. ont montré récemment que plusieurs groupes de miRNA, les miR183/96/182, miR-204 et miR-21, sont exprimés dans la rétine et les photorécepteurs de façon dynamique en fonction de l'exposition à la lumière (Krol et al., 2010). Leur niveau d'expression est environ deux fois supérieur chez les souris exposées à la lumière que chez les souris exposées à l'obscurité.

Les auteurs ont aussi montré que les variations d'expression des miR183/96/182 régulent l'expression du gène SLC1A1 qui code pour un transporteur pré-synaptique du glutamate dont l'expression est largement distribuée dans la rétine.

Finalement, les auteurs ont montré expérimentalement que ces miR183/96/182 peuvent induire la diminution forte de l'expression d'un transgène dans la rétine après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAVr. Les auteurs ont montré que cette inhibition est induite par l'exposition à la lumière, lorsque ces vecteurs portent dans leur cassette d'expression des séquences cibles pour ces miRNA.

Si les vecteurs viraux utilisés au cours de notre étude ne présentent pas de séquences cibles pour les miR183/96/186, miR204 ou encore miR-21, il nous semblerait pertinent d'évaluer la présence de telles séquences cibles dans tous les vecteurs AAVr, pour éviter une diminution de l'efficacité du transfert de gène dans la rétine.

- Parmi les facteurs pharmacologiques potentiellement défavorables à l'expression des transgènes dans la rétine, on pourrait imaginer que certains médicaments prescrits couramment en médecine humaine pourraient avoir une action dans la rétine, qui altérerait la cascade de phototransduction ou les voies de signalisation associées.

Par exemple, la dopamine qui est administrée traditionnellement chez les patients parkinsoniens, a été décrite comme pouvant induire une diminution importante de la [AMPC] dans les photorécepteurs chez la souris, par un mécanisme non déterminé (Cohen and Blazynski, 1990; Jackson et al., 2009). De ce fait, on peut se demander si l'administration orale de dopamine, peut

altérer la [AMPC] dans les photorécepteurs, et donc inhiber la voie de signalisation AMPc/PKA. Il est important de noter qu'aucune étude publiée à ce jour n'a mis en évidence un tel phénomène, et que la probabilité pour qu'il se produise est réduite, du fait que la barrière hémato-rétinienne est très peu perméable.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a montré pour la première fois que l'exposition prolongée à la lumière peut induire une baisse significative de l'expression des transgènes dans la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs, après transfert de gène à l'aide de vecteurs ssAAVr lorsque ceux-ci sont sous le contrôle du promoteur CMV. En outre, nous avons montré expérimentalement que l'effet répresseur de la lumière passe par l'activation de la cascade de phototransduction. Afin d'expliquer ce phénomène, nous proposons un modèle de régulation transcriptionnelle du promoteur CMV, *via* l'activation des voies de signalisation associées à la cascade de phototransduction, c'est-à-dire les voies de signalisation GMPc/PKG et AMPc/PKA/CREB-ATF. Les résultats de notre étude suggèrent que le promoteur CMV ne constitue pas un promoteur de choix pour la thérapie génique dans les photorécepteurs.

En outre, il semblerait pertinent de réévaluer le profil d'expression de certains promoteurs d'origines eucaryotes ou virales, qui ont été décrits ailleurs comme étant régulés par ces mêmes voies de signalisation. A titre, d'exemple on citera le promoteur CAG qui est constitué de l'enhancer du promoteur CMV et du promoteur basal du gène Beta actine de poulet, et qui a été utilisé en thérapie génique clinique dans la rétine pour le traitement de certaines formes de rétinites pigmentaires (Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2009; Maguire et al., 2008b; Niwa et al., 1991).

En outre, Il serait intéressant de déterminer si ce phénomène a aussi lieu dans la rétine d'autres modèles animaux (chien, primate) ou même chez l'homme. Cependant, pour des raisons éthiques évidentes, il semble impossible de réaliser ces expériences dans des modèles de gros animaux, et encore moins chez l'homme. De ce fait, il serait informatif d'évaluer ce phénomène *in vitro*, soit sur des cultures primaires de photorécepteurs isolés, soit sur des explants de rétine. De la même façon, il serait intéressant de déterminer si ce phénomène a aussi lieu dans la rétine de rats, transduite avec des vecteurs viraux recombinants lentivirus ou adénovirus, ainsi que dans la rétine de rats transgéniques exprimant constitutivement dans leur rétine un transgène sous le contrôle du promoteur CMV.

CONCLUSION GENERALE

La thérapie génique est une approche médicale prometteuse, qui a montré à travers le nombre croissant des réussites cliniques de cette dernière décennie, qu'elle constitue aussi une approche réaliste et pragmatique pour de nombreuses pathologies d'origines génétiques et acquises. Cependant, la très grande majorité des maladies génétiques connues, telles que les rétinites pigmentaires ou les maladies métaboliques, ne disposent pas actuellement de stratégies de thérapie génique suffisamment efficaces pour être applicables en clinique.

Le succès clinique de la thérapie génique, que ce soit dans l'œil ou dans d'autres organes, dépend principalement de 3 paramètres : la précocité du traitement afin de prévenir les lésions fonctionnelles et histologiques irréversibles, l'absence de toxicité à court ou long terme pour les patients traités, mais surtout l'efficacité du transfert de gène dans les organes d'intérêt.

Or, l'efficacité *in vivo* du transfert de gène dépend elle-même de plusieurs facteurs qui ont été au cœur du développement de la thérapie génique depuis la naissance de cette discipline : (1) le mode d'administration, (2) l'efficacité de transduction des cellules cibles par les vecteurs viraux, (3) les réponses immunes contre le vecteur et le transgène, (4) le niveau d'expression du transgène lui-même conditionné par l'environnement génétique et cellulaire et par les éléments génétiques constituant la cassette d'expression.

Les travaux de cette thèse se sont intéressés à différents aspects de l'optimisation du transfert de gène dans la rétine à l'aide des vecteurs recombinants adéno-associés (AAVr). Nous nous sommes en particulier intéressés à l'évaluation d'un nouveau mode d'administration des vecteurs AAVr par voie systémique pour transduire la rétine, et à l'évaluation de la stabilité de l'expression des vecteurs AAVr dans la rétine en fonction de l'exposition à la lumière, lorsque ces vecteurs sont sous le contrôle du promoteur CMV. Ces travaux ont pour objectif de pouvoir éventuellement servir de support pour la mise au point de stratégies de thérapie génique pour le traitement des dégénérescences héréditaires de la rétine, qu'elles soient de type syndromique ou non.

Le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer la capacité de différents vecteurs AAVr double brin, à transduire la rétine après injection systémique chez l'adulte et le nouveau-né.

Dans ce but, nous avons administré par voie intraveineuse les vecteurs de sérotypes scAAV2/1, 2/5, 2/6, 2/8 et 2/9, chez le rat et le chien, juste après la naissance ou chez l'animal adulte. Nous avons montré que les vecteurs scAAV2/8 et scAAV2/9 permettent de transduire les cellules de l'EPR de façon irrégulière, mais pas la neurorétine chez le rat nouveau-né. Nous avons aussi montré que

l'administration du vecteur scAAV2/9 chez le rat nouveau-né permet une expression stable du transgène dans une grande partie des cellules de l'EPR, sans induire de réaction immune délétère à l'expression du transgène. Cependant, lorsque ces vecteurs scAAV2/8 et 2/9 sont injectés chez le rat adulte, ils ne permettent de transduire ni les cellules de l'EPR, ni les cellules de la neurorétine.

Nous avons aussi montré que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 permet la transduction disparate mais stable des cellules de l'EPR de la zone tapétale, chez le chien et le chat nouveau-né, mais pas chez le chien et le chat adulte. Chez les chiens et chats nouveau-nés et adultes, l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 permet aussi la transduction forte des cellules du tapis. Nous avons montré que l'administration néonatale chez le chien permet de contourner le développement d'une réponse immune délétère vis-à-vis du transgène et des cellules transduites.

En conclusion, l'administration du vecteur scAAV2/9 par voie intraveineuse chez le nouveau-né permet de transduire une faible proportion des cellules de l'EPR, mais dispersée dans une très grande partie de la rétine, contrairement au mode d'administration sous-rétinien. Ce protocole permet aussi la transduction de nombreux autres organes comme cela a été montré dans des études précédentes.

De ce point de vue, ce protocole de transfert de gène pourrait avoir de nombreux bénéfices thérapeutiques pour le traitement par thérapie génique des maladies métaboliques, telles que les mucopolysaccharidoses qui affectent la rétine, le système nerveux central, et le système musculosquelettique.

Du point de vue des perspectives concernant cette étude, trois 3 pistes de recherche semblent particulièrement pertinentes :

- Afin de mieux caractériser les limites de ce protocole d'administration, il serait intéressant d'évaluer la fenêtre d'âge après la naissance qui autorise la transduction de la rétine, après injection intraveineuse du vecteur scAAV2/9 chez le rat, le chien et le chat. En outre, il serait pertinent d'évaluer la toxicité potentielle de cette approche à long terme, mais aussi de caractériser les éventuelles réactions immunitaires qui se mettent en place à court et long terme, chez les animaux injectés à la naissance ou à l'âge adulte.
- Différentes stratégies d'optimisation de ce protocole d'administration pourrait être envisagé afin d'augmenter le pourcentage de cellules de l'EPR transduites. D'une part, nous pourrions évaluer l'administration de doses de vecteurs scAAV2/9 croissantes chez le chien, mais aussi chez le primate non-humain qui est un modèle bien plus pertinent cliniquement d'un point de vue physiologique et développemental. D'autre part, nous pourrions envisager d'évaluer le tropisme oculaire d'autre sérotype d'AAV, et en particulier les vecteurs AAV mutés pour les tyrosines de

surface de la capside, et dont la capacité à échapper partiellement au protéasome pourrait améliorer globalement leur efficacité de transduction. Finalement, il serait intéressant d'évaluer différentes stratégies afin d'augmenter l'efficacité d'expression du vecteur, en optimisant sa composition en codon, ou encore en insérant une séquence de type WPRE dans la partie 3'UTR de la cassette d'expression.

- L'évaluation de la pertinence thérapeutique de ce mode d'administration pourrait être réalisée à l'aide de différents modèles animaux de DHR de type syndromique et non-syndromique. Nous disposons d'un modèle canin de DHR non syndromique causé par la mutation du gène RPE65, mais aussi plusieurs modèles canins de mucopolysaccharidoses (type I, VI et VII).

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'évaluer l'effet de l'exposition prolongée à la lumière, sur l'expression des vecteurs AAVr sous le contrôle du promoteur recombinant CMV, dans la rétine et plus particulièrement dans les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

Dans ce but, nous avons administré différents vecteurs ssAAV2/4 et ssAAV2/5 sous le contrôle de différents promoteurs, afin de cibler respectivement les cellules de l'EPR et/ou les photorécepteurs chez le rat adulte. Nous avons montré pour la première fois, que l'exposition prolongée à la lumière induit la répression de l'expression des vecteurs ssAAV2/5 uniquement dans les photorécepteurs, et uniquement lorsque ces vecteurs sont sous le contrôle du promoteur recombinant CMV. Nous avons aussi montré que l'expression du vecteur ssAA2/5.CMV.EPO est réduite de plus de 60% après une exposition prolongée à la lumière, par rapport à la condition d'éclairage cyclique utilisée traditionnellement dans les animaleries de rongeurs.

En outre, nous avons montré *in vivo* à l'aide d'un inhibiteur de l'enzyme PDE6, que cet effet répresseur dans les photorécepteurs passe par l'activation de la cascade de phototransduction. Cependant, la lourdeur financière et technique de cette approche pharmacologique *in vivo*, et particulièrement le nombre d'animaux important à inclure pour chaque test de molécule, a rendu particulièrement laborieuse la détermination des mécanismes cellulaires impliqués dans ce phénomène, et en particulier l'implication des voies de signalisations associées à la cascade de phototransduction. De ce point, il serait probablement plus pertinent d'évaluer la possibilité d'étudier *in vitro* ces mécanismes sur des cultures primaires de photorécepteurs (Romano and Hicks, 2007), ou encore sur des cultures organotypique de rétine (Donovan and Dyer, 2006). Ces approches nous permettraient d'évaluer de façon efficace et rapide divers agonistes et antagonistes, mais aussi la

reproductibilité et la spécificité de leur action, entres autres, par la mise en évidence de phénomène « d'effet-dose ». Dans cette optique, il serait particulièrement pertinent de développer une collaboration scientifique avec un laboratoire spécialisé dans ce domaine.

Finalement, nous émettons l'hypothèse que l'effet inhibiteur de la lumière a probablement lieu au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Cependant, nous n'avons pas pu mettre ceci en évidence par RT-QPCR, à cause de la forte hétérogénéité d'expression du transgène entre les individus d'un même groupe expérimentale, mais aussi à cause du « bruit de fond » induit par l'expression du transgène dans les cellules de l'EPR indépendamment des conditions de lumière . De ce point de vue, il serait pertinent de réaliser cette expérience sur deux groupes de rats composés d'au moins 30 rats chacun, l'un exposé à la condition L/O, et l'autre en condition L/L, afin de « lisser » ces variations interindividuelles. Cependant, cela serait particulièrement contraignant d'un point de vue financier, mais aussi technique car l'animalerie qui abrite nos rats dispose d'une capacité d'hébergement limitée. Une stratégie alternative consisterait à construire un vecteur exprimant le transgène dGFP sous le contrôle du promoteur CMV, mais dont l'expression serait restreinte aux photorécepteurs par le biais d'un système de régulation de type recombinaise CRE/LoxP (Li et al., 2006; Yu and Bradley, 2001)

En conclusion, nous avons montré un effet répresseur très important de la lumière et de la cascade de phototransduction, sur l'expression des vecteurs AAVr dans les photorécepteurs, lorsque ces vecteurs AAVr sont le contrôle du promoteur CMV. Ceci nous amène à suggérer que le promoteur CMV n'est pas adapté pour permettre une expression stable du transgène dans les photorécepteurs, et en particulier lorsque le contexte génétique, environnemental, ou pharmacologique favorise l'activation de la cascade de phototransduction et l'inactivation des voies de signalisation qui lui sont associées (GMPc/PKG et AMPc/PKA). Ceci nous amène aussi à suggérer qu'un certain nombre d'études expérimentales de thérapie génique, menées dans la rétine et les photorécepteurs à l'aide de vecteur AAVr sous le contrôle du promoteur CMV, n'ont pas pu évaluer de façon rigoureuse l'efficacité thérapeutique de leur vecteur, du fait que ces études ont été menées en condition d'exposition prolongée à la lumière.

Les résultats de notre étude soulignent la nécessité de prendre en compte tous les facteurs endogènes ou exogènes, qu'ils soient d'ordres génétiques, pharmacologiques ou physiologiques, qui peuvent influencer le niveau d'expression et la stabilité des vecteurs AAVr dans la rétine, ou dans d'autres organes. Ces résultats soulignent aussi la nécessité de conduire les études de thérapie génique dans un paradigme expérimental le plus proche possible de la clinique humaine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aartsen, W.M., van Cleef, K.W., Pellissier, L.P., Hoek, R.M., Vos, R.M., Blits, B., Ehlert, E.M., Balaggan, K.S., Ali, R.R., Verhaagen, J., *et al.* (2010). GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors. *PLoS ONE* 5.
- Acland, G., Aguirre, G., Bennett, J., Aleman, T., Cideciyan, A., Bencicelli, J., Dejneka, N., Pearcekelling, S., Maguire, A., and Palczewski, K. (2005). Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness. *Molecular Therapy* 12, 1072-1082.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-95.
- Aguirre, G.D., Baldwin, V., Pearce-Kelling, S., Narfstrom, K., Ray, K., and Acland, G.M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis* 4, 23.
- Ahnelt, P.K., and Kolb, H. (2000). The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Prog Retin Eye Res* 19, 711-777.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Akhtar, J., and Shukla, D. (2009). Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* 276, 7228-7236.
- Alexander, J.J., Umino, Y., Everhart, D., Chang, B., Min, S.H., Li, Q., Timmers, A.M., Hawes, N.L., Pang, J.J., Barlow, R.B., *et al.* (2007). Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 13, 685-687.
- Ali, R.R., Reichel, M.B., Thrasher, A.J., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Kanuga, N., Hunt, D.M., and Bhattacharya, S.S. (1996). Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector. *Hum Mol Genet* 5, 591-594.
- Ali, R.R., Sarra, G.M., Stephens, C., Alwis, M.D., Bainbridge, J.W., Munro, P.M., Fauser, S., Reichel, M.B., Kinnon, C., Hunt, D.M., *et al.* (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25, 306-310.
- Alkhatib, G., and Briedis, D.J. (1988). High-level eucaryotic in vivo expression of biologically active measles virus hemagglutinin by using an adenovirus type 5 helper-free vector system. *J Virol* 62, 2718-2727.
- Allocca, M., Doria, M., Petrillo, M., Colella, P., Garcia-Hoyos, M., Gibbs, D., Kim, S.R., Maguire, A., Rex, T.S., Di Vicino, U., *et al.* (2008). Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest* 118, 1955-1964.
- Allocca, M., Mussolino, C., Garcia-Hoyos, M., Sanges, D., Iodice, C., Petrillo, M., Vandenberghe, L.H., Wilson, J.M., Marigo, V., Surace, E.M., *et al.* (2007). Novel Adeno-Associated Virus Serotypes Efficiently Transduce Murine Photoreceptors. *Journal of Virology* 81, 11372-11380.
- Amado, D., Mingozzi, F., Hui, D., Bencicelli, J.L., Wei, Z., Chen, Y., Bote, E., Grant, R.L., Golden, J.A., Narfstrom, K., *et al.* (2010). Safety and Efficacy of Subretinal Readministration of a Viral Vector in Large Animals to Treat Congenital Blindness. *Science Translational Medicine* 2, 21ra16-21ra16.
- Anand, V., Duffy, B., Yang, Z., Dejneka, N.S., Maguire, A.M., and Bennett, J. (2002). A deviant immune response to viral proteins and transgene product is generated on subretinal administration of adenovirus and adeno-associated virus. *Mol Ther* 5, 125-132.
- Anglade, E., and Csaky, K.G. (1998). Recombinant adenovirus-mediated gene transfer into the adult rat retina. *Curr Eye Res* 17, 316-321.
- Appledorn, D.M., Patial, S., McBride, A., Godbehere, S., Van Rooijen, N., Parameswaran, N., and Amalfitano, A. (2008). Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol* 181, 2134-2144.
- Aragona, B.J., and Wang, Z. (2007). Opposing regulation of pair bond formation by cAMP signaling within the nucleus accumbens shell. *J Neurosci* 27, 13352-13356.

Arbetman, A.E., Lochrie, M., Zhou, S., Wellman, J., Scallan, C., Doroudchi, M.M., Randlev, B., Patarroyo-White, S., Liu, T., Smith, P., *et al.* (2005). Novel caprine adeno-associated virus (AAV) capsid (AAV-Go.1) is closely related to the primate AAV-5 and has unique tropism and neutralization properties. *J Virol* **79**, 15238-15245.

Argnani, R., Lufino, M., Manservigi, M., and Manservigi, R. (2005). Replication-competent herpes simplex vectors: design and applications. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S170-177.

Ashworth, J.L., Biswas, S., Wraith, E., and Lloyd, I.C. (2006). Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol* **51**, 1-17.

Asokan, A., Conway, J.C., Phillips, J.L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H.J., Agbandje-McKenna, M., *et al.* (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* **28**, 79-82.

Audo, I., Manes, G., Mohand-Said, S., Friedrich, A., Lancelot, M.E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Poch, O., Zanlonghi, X., Hamel, C.P., *et al.* (2010). Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 3687-3700.

Auricchio, A., Kobinger, G., Anand, V., Hildinger, M., O'Connor, E., Maguire, A.M., Wilson, J.M., and Bennett, J. (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* **10**, 3075-3081.

Auricchio, A., Rivera, V.M., Clackson, T., O'Connor, E.E., Maguire, A.M., Tolentino, M.J., Bennett, J., and Wilson, J.M. (2002). Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol Ther* **6**, 238-242.

Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., *et al.* (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**, 2231-2239.

Bainbridge, J.W., Stephens, C., Parsley, K., Demaison, C., Halfyard, A., Thrasher, A.J., and Ali, R.R. (2001). In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene Ther* **8**, 1665-1668.

Banasik, M.B., and McCray, P.B., Jr. (2010). Integrase-defective lentiviral vectors: progress and applications. *Gene Ther* **17**, 150-157.

Barabas, P., Antal, K., and Kardos, J. (2004). Light-adaptation attenuates the effects of phosphodiesterase blockade by Zaprinast in the isolated rat retina. *Neurosci Lett* **357**, 195-198.

Barlow, H.B., and Levick, W.R. (1965). The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J Physiol* **178**, 477-504.

Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., *et al.* (1991). Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* **324**, 1464-1470.

Batten, M.L., Imanishi, Y., Tu, D.C., Doan, T., Zhu, L., Pang, J., Glushakova, L., Moise, A.R., Baehr, W., Van Gelder, R.N., *et al.* (2005). Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med* **2**, e333.

Baylor, D.A., Nunn, B.J., and Schnapf, J.L. (1984). The photocurrent, noise and spectral sensitivity of rods of the monkey *Macaca fascicularis*. *J Physiol* **357**, 575-607.

Bellhorn, R.W. (1981). Permeability of blood-ocular barriers of neonatal and adult cats to fluorescein-labeled dextrans of selected molecular sizes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **21**, 282-290.

Bello, A., Tran, K., Chand, A., Doria, M., Allocca, M., Hildinger, M., Beniac, D., Kranendonk, C., Auricchio, A., and Kobinger, G.P. (2009). Isolation and evaluation of novel adeno-associated virus sequences from porcine tissues. *Gene Therapy* **16**, 1320-1328.

Beltran, W.A., Boye, S.L., Boye, S.E., Chiodo, V.A., Lewin, A.S., Hauswirth, W.W., and Aguirre, G.D. (2010). rAAV2/5 gene-targeting to rods:dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters. *Gene Therapy* **17**, 1162-1174.

Bennett, J. (2003). Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther* **10**, 977-982.

Bennett, J., Maguire, A.M., Cideciyan, A.V., Schnell, M., Glover, E., Anand, V., Aleman, T.S., Chirmule, N., Gupta, A.R., Huang, Y., *et al.* (1999). Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer to monkey retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9920-9925.

Bennett, J., Tanabe, T., Sun, D., Zeng, Y., Kjeldbye, H., Gouras, P., and Maguire, A.M. (1996). Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med* **2**, 649-654.

Bennett, J., Wilson, J., Sun, D., Forbes, B., and Maguire, A. (1994). Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer into adult murine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2535-2542.

Bennett, J., Zeng, Y., Bajwa, R., Klatt, L., Li, Y., and Maguire, A.M. (1998). Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther* 5, 1156-1164.

Bennicelli, J., Wright, J.F., Komaromy, A., Jacobs, J.B., Hauck, B., Zeleniaia, O., Mingozzi, F., Hui, D., Chung, D., Rex, T.S., *et al.* (2008). Reversal of Blindness in Animal Models of Leber Congenital Amaurosis Using Optimized AAV2-mediated Gene Transfer. *Molecular Therapy* 16, 458-465.

Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B., and Neidhardt, J. (2010). The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 29, 335-375.

Berges, B.K., Wolfe, J.H., and Fraser, N.W. (2007). Transduction of brain by herpes simplex virus vectors. *Mol Ther* 15, 20-29.

Berns, K.I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54, 316-329.

Berns, K.I., and Adler, S. (1972). Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J Virol* 9, 394-396.

Berson, D.M. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26, 314-320.

Berson, E.L. (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 1659-1676.

Berto, E., Bozac, A., and Marconi, P. (2005). Development and application of replication-incompetent HSV-1-based vectors. *Gene Ther* 12 Suppl 1, S98-102.

Bertran, J., Miller, J.L., Yang, Y., Fenimore-Justman, A., Rueda, F., Vanin, E.F., and Nienhuis, A.W. (1996). Recombinant adeno-associated virus-mediated high-efficiency, transient expression of the murine cationic amino acid transporter (ecotropic retroviral receptor) permits stable transduction of human HeLa cells by ecotropic retroviral vectors. *J Virol* 70, 6759-6766.

Biffi, A., and Naldini, L. (2005). Gene therapy of storage disorders by retroviral and lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 16, 1133-1142.

Bill, A., and Nilsson, S.F. (1985). Control of ocular blood flow. *J Cardiovasc Pharmacol* 7 Suppl 3, S96-102.

Bill, A., Sperber, G., and Ujiie, K. (1983). Physiology of the choroidal vascular bed. *Int Ophthalmol* 6, 101-107.

Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., Sereno, M.S., Brandt, C.D., Kim, H.W., Parrott, R.H., and Chanock, R.M. (1971). A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* 94, 359-366.

Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2006). Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci* 63, 2145-2161.

Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.

Bloomfield, S.A., and Dacheux, R.F. (2001). Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 20, 351-384.

Bohra, L.I., Weizer, J.S., Lee, A.G., and Lewis, R.A. (2000). Vision loss as the presenting sign in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neuroophthalmol* 20, 111-115.

Boldogkoi, Z., Sik, A., Denes, A., Reichart, A., Toldi, J., Gerendai, I., Kovacs, K.J., and Palkovits, M. (2004). Novel tracing paradigms--genetically engineered herpesviruses as tools for mapping functional circuits within the CNS: present status and future prospects. *Prog Neurobiol* 72, 417-445.

Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G., and Bergen, A.A. (2010a). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res* 29, 1-18.

Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G.M.F., and Bergen, A.A.B. (2010b). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research* 29, 1-18.

Bossis, I., and Chiorini, J.A. (2003). Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles. *J Virol* 77, 6799-6810.

Bostick, B., Ghosh, A., Yue, Y., Long, C., and Duan, D. (2007). Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther* 14, 1605-1609.

Boulanger, A., Liu, S., Henningsgaard, A.A., Yu, S., and Redmond, T.M. (2000). The upstream region of the Rpe65 gene confers retinal pigment epithelium-specific expression in vivo and in vitro and contains critical octamer and E-box binding sites. *J Biol Chem* 275, 31274-31282.

Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Human Gene Therapy* 21, 704-712.

Boycott, B.B., and Hopkins, J.M. (1991). Cone bipolar cells and cone synapses in the primate retina. *Vis Neurosci* 7, 49-60.

Boye, S.E., Boye, S.L., Pang, J., Ryals, R., Everhart, D., Umino, Y., Neeley, A.W., Besharse, J., Barlow, R., and Hauswirth, W.W. (2010). Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse. *PLoS ONE* 5, e11306.

Bozorg, S., Ramirez-Montealegre, D., Chung, M., and Pearce, D.A. (2009). Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (JNCL) and the eye. *Surv Ophthalmol* 54, 463-471.

Braekevelt, C.R., and Hollenberg, M.J. (1970). Development of the retinal pigment epithelium, choriocapillaris and Bruch's membrane in the albino rat. *Exp Eye Res* 9, 124-131.

Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793, 605-614.

Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S., Osborne, N., and Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 25, 397-424.

Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., and Palmiter, R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 836-840.

Broderick, C., Duncan, L., Taylor, N., and Dick, A.D. (2000). IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2613-2622.

Brooks, A.I., Stein, C.S., Hughes, S.M., Heth, J., McCray, P.M., Jr., Sauter, S.L., Johnston, J.C., Cory-Slechta, D.A., Federoff, H.J., and Davidson, B.L. (2002). Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6216-6221.

Brown, B.D., and Naldini, L. (2009). Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 10, 578-585.

Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi Sergi, L., and Naldini, L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12, 585-591.

Brunetti-Pierri, N., and Ng, P. (2008). Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther* 15, 553-560.

Brunetti-Pierri, N., Ng, T., Iannitti, D.A., Palmer, D.J., Beaudet, A.L., Finegold, M.J., Carey, K.D., Cioffi, W.G., and Ng, P. (2006). Improved hepatic transduction, reduced systemic vector dissemination, and long-term transgene expression by delivering helper-dependent adenoviral vectors into the surgically isolated liver of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 17, 391-404.

Bunt-Milam, A.H., Saari, J.C., Klock, I.B., and Garwin, G.G. (1985). Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1377-1380.

Burns, M.E., and Arshavsky, V.Y. (2005). Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48, 387-401.

Butti, E., Bergami, A., Recchia, A., Brambilla, E., Franciotta, D., Cattalini, A., Stornaiuolo, A., Lachapelle, F., Comi, G., Mavilio, F., *et al.* (2008). Absence of an intrathecal immune reaction to a helper-dependent adenoviral vector delivered into the cerebrospinal fluid of non-human primates. *Gene Ther* 15, 233-238.

Cairns, J.E. (1959). Normal Development of the Hyaloid and Retinal Vessels in the Rat. *British Journal of Ophthalmology* 43, 385-393.

Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* 199, 381-390.

Campochiaro, P.A., Nguyen, Q.D., Shah, S.M., Klein, M.L., Holz, E., Frank, R.N., Saperstein, D.A., Gupta, A., Stout, J.T., Macko, J., *et al.* (2006). Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 17, 167-176.

Cancedda, L., Putignano, E., Impey, S., Maffei, L., Ratto, G.M., and Pizzorusso, T. (2003). Patterned vision causes CRE-mediated gene expression in the visual cortex through PKA and ERK. *J Neurosci* 23, 7012-7020.

Cardone, M., Polito, V.A., Pepe, S., Mann, L., D'Azzo, A., Auricchio, A., Ballabio, A., and Cosma, M.P. (2006). Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery. *Hum Mol Genet* *15*, 1225-1236.

Carroll, D. (2008). Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy* *15*, 1463-1468.

Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., *et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* *326*, 818-823.

Cashman, S.M., McCullough, L., and Kumar-Singh, R. (2007). Improved Retinal Transduction In Vivo and Photoreceptor-specific Transgene Expression Using Adenovirus Vectors With Modified Penton Base. *Molecular Therapy* *15*, 1640-1646.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* *288*, 669-672.

Cearley, C.N., and Wolfe, J.H. (2007). A Single Injection of an Adeno-Associated Virus Vector into Nuclei with Divergent Connections Results in Widespread Vector Distribution in the Brain and Global Correction of a Neurogenetic Disease. *Journal of Neuroscience* *27*, 9928-9940.

Chadderton, N., Millington-Ward, S., Palfi, A., O'Reilly, M., Tuohy, G., Humphries, M.M., Li, T., Humphries, P., Kenna, P.F., and Farrar, G.J. (2009). Improved retinal function in a mouse model of dominant retinitis pigmentosa following AAV-delivered gene therapy. *Mol Ther* *17*, 593-599.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* *10*, 940-954.

Chen, C.L., Jensen, R.L., Schnepp, B.C., Connell, M.J., Shell, R., Sferra, T.J., Bartlett, J.S., Clark, K.R., and Johnson, P.R. (2005). Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* *79*, 14781-14792.

Chen, H.H., Mack, L.M., Kelly, R., Ontell, M., Kochanek, S., and Clemens, P.R. (1997). Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1645-1650.

Chen, L., Yang, P., and Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* *10*, 27-39.

Chevez-Barríos, P., Chintagumpala, M., Mieler, W., Paysse, E., Boniuk, M., Kozinets, C., Hurwitz, M.Y., and Hurwitz, R.L. (2005). Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol* *23*, 7927-7935.

Chirmule, N., Probert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* *6*, 1574-1583.

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.

Christine, C.W., Starr, P.A., Larson, P.S., Eberling, J.L., Jagust, W.J., Hawkins, R.A., VanBrocklin, H.F., Wright, J.F., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2009). Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* *73*, 1662-1669.

Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Schmidt, H.H., Wehnes, E., Muller, T., Pring-Akerblom, P., and Burger, R. (2001). Complement activation by recombinant adenoviruses. *Gene Ther* *8*, 1794-1800.

Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H. (1997). *Retroviruses* (Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Cohen, A.I., and Blazynski, C. (1990). Dopamine and its agonists reduce a light-sensitive pool of cyclic AMP in mouse photoreceptors. *Vis Neurosci* *4*, 43-52.

Coura Rdos, S., and Nardi, N.B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J* *4*, 99.

Cuevas-Bennett, C., and Shenk, T. (2008). Dynamic histone H3 acetylation and methylation at human cytomegalovirus promoters during replication in fibroblasts. *J Virol* *82*, 9525-9536.

Cunha-Vaz, J. (1979). The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol* *23*, 279-296.

Cunha-Vaz, J.G. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. II. Breakdown of the blood-retinal barrier by injury. *Br J Ophthalmol* *50*, 454-462.

Cunningham, S.C., Dane, A.P., Spinoulas, A., Logan, G.J., and Alexander, I.E. (2008). Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Mol Ther* *16*, 1081-1088.

- Curcio, C.A., Sloan, K.R., Jr., Packer, O., Hendrickson, A.E., and Kalina, R.E. (1987). Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science* *236*, 579-582.
- Curcio, C.A., Sloan, K.R., Kalina, R.E., and Hendrickson, A.E. (1990). Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* *292*, 497-523.
- Dacey, D.M. (1993). The mosaic of midget ganglion cells in the human retina. *J Neurosci* *13*, 5334-5355.
- Dalkara, D., Kolstad, K.D., Caporale, N., Visel, M., Klimczak, R.R., Schaffer, D.V., and Flannery, J.G. (2009). Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther* *17*, 2096-2102.
- Dartt, D.A., Besharse, J.C., and Dana, R. (2010). *Encyclopedia of the eye*, 1st edn (Boston, MA, Elsevier).
- David, A.L., and Peebles, D. (2008). Gene therapy for the fetus: is there a future? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* *22*, 203-218.
- Davidson, B.L., Stein, C.S., Heth, J.A., Martins, I., Kotin, R.M., Derksen, T.A., Zabner, J., Ghodsi, A., and Chiorini, J.A. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3428-3432.
- Davison, A.J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* *143*, 52-69.
- Davson, H., Duke-Elder, W.S., Maurice, D.M., Ross, E.J., and Woodin, A.M. (1949). The penetration of some electrolytes and non-electrolytes into the aqueous humour and vitreous body of the cat. *J Physiol* *108*, 203-217.
- De Stefano, M.E., and Mugnaini, E. (1997). Fine structure of the choroidal coat of the avian eye. Lymphatic vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *38*, 1241-1260.
- Dejneka, N.S., Surace, E.M., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Lyubarsky, A., Savchenko, A., Redmond, T.M., Tang, W., Wei, Z., Rex, T.S., *et al.* (2004). In utero gene therapy rescues vision in a murine model of congenital blindness. *Mol Ther* *9*, 182-188.
- den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekeop, R.K., and Cremers, F.P. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* *27*, 391-419.
- Dodiya, H.B., Bjorklund, T., Stansell, J., 3rd, Mandel, R.J., Kirik, D., and Kordower, J.H. (2010). Differential transduction following basal ganglia administration of distinct pseudotyped AAV capsid serotypes in nonhuman primates. *Mol Ther* *18*, 579-587.
- Doherty, D. (2009). Joubert syndrome: insights into brain development, cilium biology, and complex disease. *Semin Pediatr Neurol* *16*, 143-154.
- Donello, J.E., Loeb, J.E., and Hope, T.J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* *72*, 5085-5092.
- Donovan, S.L., and Dyer, M.A. (2006). Preparation and square wave electroporation of retinal explant cultures. *Nat Protoc* *1*, 2710-2718.
- Drenser, K.A., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., and Lewin, A.S. (1998). Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *39*, 681-689.
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J., and Engelhardt, J.F. (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* *105*, 1573-1587.
- Dudley, R.W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Nalbantoglu, J., Petrof, B.J., and Karpati, G. (2004). Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther* *15*, 145-156.
- Duisit, G., Conrath, H., Saleun, S., Folliot, S., Provost, N., Cosset, F.L., Sandrin, V., Moullier, P., and Rolling, F. (2002). Five recombinant simian immunodeficiency virus pseudotypes lead to exclusive transduction of retinal pigmented epithelium in rat. *Mol Ther* *6*, 446-454.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* *17*, 1187-1196.
- Eberling, J.L., Jagust, W.J., Christine, C.W., Starr, P., Larson, P., Bankiewicz, K.S., and Aminoff, M.J. (2008). Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* *70*, 1980-1983.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *The Journal of Gene Medicine* *9*, 833-842.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., Wixon, J., and Edelstein, R.M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *The Journal of Gene Medicine* *6*, 597-602.
- El-Bakkouri, M., Fabry, C.M., Fender, P., and Schoehn, G. (2008). Structure des adénovirus. *Virologie* *12*, 275-292.

Ellinwood, N.M., Vite, C.H., and Haskins, M.E. (2004). Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *The Journal of Gene Medicine* 6, 481-506.

Epstein, A.L. (2005a). HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. *Gene Ther* 12 *Suppl* 1, S154-158.

Epstein, A.L. (2005b). HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for preventive or therapeutic gene transfer: an overview. *Gene Ther* 12 *Suppl* 1, S153.

Esumi, N., Oshima, Y., Li, Y., Campochiaro, P.A., and Zack, D.J. (2004). Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation. *J Biol Chem* 279, 19064-19073.

Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C., and Koutalos, Y. (2001). Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 81, 117-151.

Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., and LaVail, M.M. (1992). Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 12, 3554-3567.

Farber, D.B., Souza, D.W., Chase, D.G., and Lolley, R.N. (1981). Cyclic nucleotides of cone-dominant retinas. Reduction of cyclic AMP levels by light and by cone degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20, 24-31.

Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70, 3227-3234.

Finlay, B.L. (2008). The developing and evolving retina: using time to organize form. *Brain Res* 1192, 5-16.

Finn, J.D., Hui, D., Downey, H.D., Dunn, D., Pien, G.C., Mingozzi, F., Zhou, S., and High, K.A. (2010). Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol Ther* 18, 135-142.

Fisher, K.J., Gao, G.P., Weitzman, M.D., DeMatteo, R., Burda, J.F., and Wilson, J.M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 70, 520-532.

Flannery, J.G., Zolotukhin, S., Vaquero, M.I., LaVail, M.M., Muzyczka, N., and Hauswirth, W.W. (1997). Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6916-6921.

Fleury, S., Driscoll, R., Simeoni, E., Dudler, J., von Segesser, L.K., Kappenberger, L., and Vassalli, G. (2004). Helper-dependent adenovirus vectors devoid of all viral genes cause less myocardial inflammation compared with first-generation adenovirus vectors. *Basic Res Cardiol* 99, 247-256.

Flotte, T.R. (2007). Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol* 213, 301-305.

Flotte, T.R., and Berns, K.I. (2005). Adeno-associated virus: a ubiquitous commensal of mammals. *Hum Gene Ther* 16, 401-407.

Flower, R.W., McLeod, D.S., Lutty, G.A., Goldberg, B., and Wajer, S.D. (1985). Postnatal retinal vascular development of the puppy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 957-968.

Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M.G., and Naldini, L. (2004). Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 103, 3700-3709.

Follenzi, A., Santambrogio, L., and Annoni, A. (2007). Immune responses to lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 7, 306-315.

Folliot, S., Briot, D., Conrath, H., Provost, N., Cherel, Y., Moullier, P., and Rolling, F. (2003). Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med* 5, 493-501.

Forrester, J.V., Xu, H., Lambe, T., and Cornell, R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunology* 1, 372-381.

Foster, A., Gilbert, C., and Johnson, G. (2008). Changing patterns in global blindness: 1988-2008. *Community Eye Health* 21, 37-39.

Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol* 27, 59-65.

Foust, K.D., Poirier, A., Pacak, C.A., Mandel, R.J., and Flotte, T.R. (2008). Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons. *Hum Gene Ther* 19, 61-70.

Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H., *et al.* (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol* 28, 271-274.

Fraefel, C., Mendes-Madeira, A., Mabon, O., Lefebvre, A., Le Meur, G., Ackermann, M., Moullier, P., and Rolling, F. (2005). In vivo gene transfer to the rat retina using herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-based amplicon vectors. *Gene Ther* 12, 1283-1288.

Friedmann, T. (1992). A brief history of gene therapy. *Nat Genet* 2, 93-98.

Friedmann, T. (1993). Gene therapy--a new kind of medicine. *Trends Biotechnol* 11, 156-159.

Friedmann, T., and Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949-955.

Fruttiger, M. (2007). Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77-88.

Fu, H., Muenzer, J., Samulski, R.J., Breese, G., Sifford, J., Zeng, X., and McCarty, D.M. (2003). Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther* 8, 911-917.

Fu, H., Samulski, R.J., McCown, T.J., Picornell, Y.J., Fletcher, D., and Muenzer, J. (2002). Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus-mediated gene delivery. *Mol Ther* 5, 42-49.

Fukuhara, C. (2004). Gating of the cAMP Signaling Cascade and Melatonin Synthesis by the Circadian Clock in Mammalian Retina. *Journal of Neuroscience* 24, 1803-1811.

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 78, 6381-6388.

Gao, G., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M. (2005). New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5, 285-297.

Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859.

Gardner, T.W., Lieth, E., Khin, S.A., Barber, A.J., Bonsall, D.J., Leshner, T., Rice, K., and Brennan, W.A., Jr. (1997). Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2423-2427.

Gargiulo, A., Bonetti, C., Montefusco, S., Neglia, S., Di Vicino, U., Marrocco, E., Corte, M.D., Domenici, L., Auricchio, A., and Surace, E.M. (2009). AAV-mediated tyrosinase gene transfer restores melanogenesis and retinal function in a model of oculo-cutaneous albinism type I (OCA1). *Mol Ther* 17, 1347-1354.

Gariano, R.F. (2010). Special features of human retinal angiogenesis. *Eye (Lond)* 24, 401-407.

Gariano, R.F., and Gardner, T.W. (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438, 960-966.

Gaspar, H.B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K.C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L.D., *et al.* (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14, 505-513.

Gaspar, H.B., Parsley, K.L., Howe, S., King, D., Gilmour, K.C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.

Giove, T.J., Sena-Esteves, M., and Eldred, W.D. (2010). Transduction of the inner mouse retina using AAVrh8 and AAVrh10 via intravitreal injection. *Exp Eye Res* 91, 652-659.

Glatzel, M., Flechsig, E., Navarro, B., Klein, M.A., Paterna, J.C., Bueler, H., and Aguzzi, A. (2000). Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 442-447.

Glushakova, L.G., Timmers, A.M., Issa, T.M., Cortez, N.G., Pang, J., Teusner, J.T., and Hauswirth, W.W. (2006). Does recombinant adeno-associated virus-vectored proximal region of mouse rhodopsin promoter support only rod-type specific expression in vivo? *Mol Vis* 12, 298-309.

Goebel, H.H., and Wisniewski, K.E. (2004). Current state of clinical and morphological features in human NCL. *Brain Pathol* 14, 61-69.

Gollisch, T., and Meister, M. (2010). Eye smarter than scientists believed: neural computations in circuits of the retina. *Neuron* 65, 150-164.

Gregerson, D.S., Heuss, N.D., Lehmann, U., and McPherson, S.W. (2009). Peripheral induction of tolerance by retinal antigen expression. *J Immunol* 183, 814-822.

Greiner, J.V., and Weidman, T.A. (1991). Comparative histogenesis of Bruch's membrane (complexus basalis). *Exp Eye Res* 53, 47-54.

Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2005). Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol* 79, 9933-9944.

Grigull, L., Beilken, A., Schrappe, M., Das, A., Luecke, T., Sander, A., Stanulla, M., Rehe, K., Sauer, M., Schmid, H., *et al.* (2005). Transplantation of allogeneic CD34-selected stem cells after fludarabine-based conditioning regimen for children with mucopolysaccharidosis 1H (M. Hurler). *Bone Marrow Transplant* 35, 265-269.

Grimm, D. (2009). Small silencing RNAs: State-of-the-art☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 672-703.

Grunert, U., and Martin, P.R. (1991). Rod bipolar cells in the macaque monkey retina: immunoreactivity and connectivity. *J Neurosci* 11, 2742-2758.

Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., and Steven, A.C. (2003). Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302, 1396-1398.

Gruter, O., Kostic, C., Crippa, S.V., Perez, M.T., Zografos, L., Schorderet, D.F., Munier, F.L., and Arsenijevic, Y. (2005). Lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse photoreceptors is impaired by the presence of a physical barrier. *Gene Ther* 12, 942-947.

Gundersen, D., Orlowski, J., and Rodriguez-Boulan, E. (1991). Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol* 112, 863-872.

Gundersen, D., Powell, S.K., and Rodriguez-Boulan, E. (1993). Apical polarization of N-CAM in retinal pigment epithelium is dependent on contact with the neural retina. *J Cell Biol* 121, 335-343.

Habib, N.A., Hodgson, H.J., Lemoine, N., and Pignatelli, M. (1999). A phase I/II study of hepatic artery infusion with wtp53-CMV-Ad in metastatic malignant liver tumours. *Hum Gene Ther* 10, 2019-2034.

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., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.

Hackett, N.R., Redmond, D.E., Sondhi, D., Giannaris, E.L., Vassallo, E., Stratton, J., Qiu, J., Kaminsky, S.M., Lesser, M.L., Fisch, G.S., *et al.* (2005). Safety of direct administration of AAV2(CU)hCLN2, a candidate treatment for the central nervous system manifestations of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, to the brain of rats and nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 16, 1484-1503.

Hadaczek, P., Eberling, J.L., Pivrotto, P., Bringas, J., Forsayeth, J., and Bankiewicz, K.S. (2010). Eight Years of Clinical Improvement in MPTP-Lesioned Primates After Gene Therapy With AAV2-hAADC. *Molecular Therapy* 18, 1458-1461.

Haire, S.E. (2006). Light-Driven Cone Arrestin Translocation in Cones of Postnatal Guanylate Cyclase-1 Knockout Mouse Retina Treated with AAV-GC1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47, 3745-3753.

Hajjar, R.J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Ly, H., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., *et al.* (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail* 14, 355-367.

Halbert, C.L., Rutledge, E.A., Allen, J.M., Russell, D.W., and Miller, A.D. (2000). Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol* 74, 1524-1532.

Halfter, W., Dong, S., Dong, A., Eller, A.W., and Nischt, R. (2008). Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. *Eye* 22, 1207-1213.

Haltia, M. (2006). The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. *Biochim Biophys Acta* 1762, 850-856.

Hamel, C.P. (2007). Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis* 2, 7.

Hartong, D.T., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795-1809.

Hashimoto, T., Gibbs, D., Lillo, C., Azarian, S.M., Legacki, E., Zhang, X.M., Yang, X.J., and Williams, D.S. (2007). Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther* 14, 584-594.

Haskins, M. (2009). Gene therapy for lysosomal storage diseases (LSDs) in large animal models. *ILAR J* 50, 112-121.

Hauk, B., Chen, L., and Xiao, W. (2003). Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 7, 419-425.

Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J., *et al.* (2008). Treatment of Leber Congenital Amaurosis Due to RPE65 Mutations by Ocular Subretinal Injection of Adeno-Associated Virus Gene Vector: Short-Term Results of a Phase I Trial. *Human Gene Therapy* 19, 979-990.

Heldermon, C.D., Ohlemiller, K.K., Herzog, E.D., Vogler, C., Qin, E., Wozniak, D.F., Tan, Y., Orrock, J.L., and Sands, M.S. (2010). Therapeutic efficacy of bone marrow transplant, intracranial AAV-mediated gene therapy, or both in the mouse model of MPS IIIB. *Mol Ther* 18, 873-880.

Heldwein, E.E., and Krummenacher, C. (2008). Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 1653-1668.

Hellström, M., Ruitenberg, M.J., Pollett, M.A., Ehlert, E.M.E., Twisk, J., Verhaagen, J., and Harvey, A.R. (2008). Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Therapy* 16, 521-532.

Hennig, A.K., Ogilvie, J.M., Ohlemiller, K.K., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., and Sands, M.S. (2004). AAV-mediated intravitreal gene therapy reduces lysosomal storage in the retinal pigmented epithelium and improves retinal function in adult MPS VII mice. *Mol Ther* 10, 106-116.

Herzog, R.W., Yang, E.Y., Couto, L.B., Hagstrom, J.N., Elwell, D., Fields, P.A., Burton, M., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., *et al.* (1999). Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 5, 56-63.

Hirabayashi, Y., Fujimori, O., and Shimizu, S. (2003). Bruch's membrane of the brachymorphic mouse. *Med Electron Microsc* 36, 139-146.

Hobbs, J.R., Hugh-Jones, K., Barrett, A.J., Byrom, N., Chambers, D., Henry, K., James, D.C., Lucas, C.F., Rogers, T.R., Benson, P.F., *et al.* (1981). Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 2, 709-712.

Hoffman, L.M., Maguire, A.M., and Bennett, J. (1997). Cell-mediated immune response and stability of intraocular transgene expression after adenovirus-mediated delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2224-2233.

Hogan, M.J., Alvarado, J.A., and Weddell, J.E. (1971). *Histology of the human eye; an atlas and textbook* (Philadelphia, Saunders).

Holder, G.E. (2001). Pattern electroretinography (PERG) and an integrated approach to visual pathway diagnosis. *Prog Retin Eye Res* 20, 531-561.

Hollyfield, J.G. (1999). Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2767-2769.

Hu, C., Busuttill, R.W., and Lipshutz, G.S. (2010). RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy. *J Gene Med* 12, 766-778.

Huang, B., Schiefer, J., Sass, C., Landwehrmeyer, G.B., Kosinski, C.M., and Kochanek, S. (2007). High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 18, 303-311.

Hueffer, K., and Parrish, C.R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6, 392-398.

Hunninghake, G.W., Monick, M.M., Liu, B., and Stinski, M.F. (1989). The promoter-regulatory region of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains functional cyclic AMP-response elements. *J Virol* 63, 3026-3033.

Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Miyazaki, M., Kohno, R., Murakami, Y., Murata, T., Goto, Y., Tabata, T., Ueda, Y., Ono, F., *et al.* (2009). Acute toxicity study of a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector for retinal gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 20, 943-954.

Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T., Gibson, G., McTiernan, C., Kay, M., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy* 14, 45-53.

Jackson, C.R., Chaurasia, S.S., Zhou, H., Haque, R., Storm, D.R., and Iuvone, P.M. (2009). Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *J Neurochem* 109, 148-157.

Jacobson, S., Acland, G., Aguirre, G., Aleman, T., Schwartz, S., Cideciyan, A., Zeiss, C., Komaromy, A., Kaushal, S., and Roman, A. (2006). Safety of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2–RPE65 Vector Delivered by Ocular Subretinal Injection. *Molecular Therapy* *13*, 1074-1084.

Jadhav, A.P., Roesch, K., and Cepko, C.L. (2009). Development and neurogenic potential of Muller glial cells in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* *28*, 249-262.

Jager, R.D., Mieler, W.F., and Miller, J.W. (2008). Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* *358*, 2606-2617.

Johannessen, M., Delghandi, M.P., and Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* *16*, 1211-1227.

Johnson, P.A., Miyahara, A., Levine, F., Cahill, T., and Friedmann, T. (1992). Cytotoxicity of a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *J Virol* *66*, 2952-2965.

Jomary, C., Piper, T.A., Dickson, G., Couture, L.A., Smith, A.E., Neal, M.J., and Jones, S.E. (1994). Adenovirus-mediated gene transfer to murine retinal cells in vitro and in vivo. *FEBS Lett* *347*, 117-122.

Joyner, A., Keller, G., Phillips, R.A., and Bernstein, A. (1983). Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* *305*, 556-558.

Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* *17*, 314-317.

Kakkis, E.D., Muenzer, J., Tiller, G.E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Izykowski, B., Phillips, J., Doroshov, R., Walot, I., *et al.* (2001). Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* *344*, 182-188.

Kaneko, H., Nishiguchi, K.M., Nakamura, M., Kachi, S., and Terasaki, H. (2008). Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *49*, 4162-4168.

Kaur, C., Foulds, W., and Ling, E. (2008). Blood–retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Progress in Retinal and Eye Research* *27*, 622-647.

Keller, M.J., Wu, A.W., Andrews, J.I., McGonagill, P.W., Tibesar, E.E., and Meier, J.L. (2007). Reversal of human cytomegalovirus major immediate-early enhancer/promoter silencing in quiescently infected cells via the cyclic AMP signaling pathway. *J Virol* *81*, 6669-6681.

Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A., and Kleinschmidt, J.A. (2003). Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *J Virol* *77*, 11072-11081.

Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J., and Byrne, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 14082-14087.

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. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* *48*, 3954-3961.

Kim, I.H., Jozkowicz, A., Piedra, P.A., Oka, K., and Chan, L. (2001). Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13282-13287.

Kisselev, O.G. (2005). Focus on molecules: rhodopsin. *Exp Eye Res* *81*, 366-367.

Klimczak, R.R., Koerber, J.T., Dalkara, D., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2009). A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. *PLoS ONE* *4*, e7467.

Kobayashi, H., Carbonaro, D., Pepper, K., Petersen, D., Ge, S., Jackson, H., Shimada, H., Moats, R., and Kohn, D.B. (2005). Neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector. *Mol Ther* *11*, 776-789.

Koeberl, D.D., Kishnani, P.S., Bali, D., and Chen, Y.T. (2009). Emerging therapies for glycogen storage disease type I. *Trends Endocrinol Metab* *20*, 252-258.

Koehler, R.C., Roman, R.J., and Harder, D.R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* *32*, 160-169.

Koenekoop, R.K. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* *49*, 379-398.

Koerber, J.T., Klimczak, R., Jang, J.H., Dalkara, D., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2009). Molecular evolution of adeno-associated virus for enhanced glial gene delivery. *Mol Ther* *17*, 2088-2095.

Koilkonda, R.D., Hauswirth, W.W., and Guy, J. (2009). Efficient expression of self-complementary AAV in ganglion cells of the ex vivo primate retina. *Mol Vis* *15*, 2796-2802.

Komaromy, A.M., Alexander, J.J., Cooper, A.E., Chiodo, V.A., Glushakova, L.G., Acland, G.M., Hauswirth, W.W., and Aguirre, G.D. (2008). Targeting gene expression to cones with human cone opsin promoters in recombinant AAV. *Gene Ther* 15, 1049-1055.

Komaromy, A.M., Alexander, J.J., Rowlan, J.S., Garcia, M.M., Chiodo, V.A., Kaya, A., Tanaka, J.C., Acland, G.M., Hauswirth, W.W., and Aguirre, G.D. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 19, 2581-2593.

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., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2211-2215.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108, 229-241.

Kraft, T.W., Schneeweis, D.M., and Schnapf, J.L. (1993). Visual transduction in human rod photoreceptors. *J Physiol* 464, 747-765.

Kreppel, F., Luther, T.T., Semkova, I., Schraermeyer, U., and Kochanek, S. (2002). Long-term transgene expression in the RPE after gene transfer with a high-capacity adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1965-1970.

Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribic, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schubeler, D., *et al.* (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141, 618-631.

Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., and Sutton, R.E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 12, 1893-1905.

Kuwabara, T., and Cogan, D.G. (1963). Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol* 69, 492-502.

Kyriakouli, D.S., Boesch, P., Taylor, R.W., and Lightowers, R.N. (2008). Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15, 1017-1023.

Lai, C.M., Estcourt, M.J., Wikstrom, M., Himbeck, R.P., Barnett, N.L., Brankov, M., Tee, L.B., Dunlop, S.A., Degli-Esposti, M.A., and Rakoczy, E.P. (2009). rAAV.sFlt-1 gene therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 4279-4287.

Lai, C.M., Yu, M.J., Brankov, M., Barnett, N.L., Zhou, X., Redmond, T.M., Narfstrom, K., and Rakoczy, P.E. (2004). Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene delivery into the Rpe65^{-/-} knockout mouse eye results in limited rescue. *Genet Vaccines Ther* 2, 3.

Lasaro, M.O., and Ertl, H.C. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther* 17, 1333-1339.

Lau, D., and Flannery, J. (2003). Viral-mediated FGF-2 treatment of the constant light damage model of photoreceptor degeneration. *Doc Ophthalmol* 106, 89-98.

Lau, D., McGee, L.H., Zhou, S., Rendahl, K.G., Manning, W.C., Escobedo, J.A., and Flannery, J.G. (2000). Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3622-3633.

Le Goff, M.M., and Bishop, P.N. (2008). Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* 22, 1214-1222.

Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y., *et al.* (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* 14, 292-303.

Le Roy, F., Charton, K., Lorson, C.L., and Richard, I. (2009). RNA-targeting approaches for neuromuscular diseases. *Trends Mol Med* 15, 580-591.

Lee, J., Myers, C.A., Williams, N., Abdelaziz, M., and Corbo, J.C. (2010). Quantitative fine-tuning of photoreceptor cis-regulatory elements through affinity modulation of transcription factor binding sites. *Gene Ther*.

Lehman, I.R., and Boehmer, P.E. (1999). Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* 274, 28059-28062.

Lei, B., Zhang, K., Yue, Y., Ghosh, A., and Duan, D. (2009). Adeno-associated virus serotype-9 efficiently transduces the retinal outer plexiform layer. *Mol Vis* 15, 1374-1382.

Levick, W.R. (1967). Receptive fields and trigger features of ganglion cells in the visual streak of the rabbits retina. *J Physiol* 188, 285-307.

Lewin, A.S., Drenser, K.A., Hauswirth, W.W., Nishikawa, S., Yasumura, D., Flannery, J.G., and LaVail, M.M. (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 4, 967-971.

Lewin, A.S., and Hauswirth, W.W. (2001). Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 7, 221-228.

Li, Q., Miller, R., Han, P.Y., Pang, J., Dinculescu, A., Chiodo, V., and Hauswirth, W.W. (2008a). Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol Vis* 14, 1760-1769.

Li, Q., Timmers, A.M., Guy, J., Pang, J., and Hauswirth, W.W. (2008b). Cone-specific expression using a human red opsin promoter in recombinant AAV. *Vision Res* 48, 332-338.

Li, T., Adamian, M., Roof, D.J., Berson, E.L., Dryja, T.P., Roessler, B.J., and Davidson, B.L. (1994). In vivo transfer of a reporter gene to the retina mediated by an adenoviral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2543-2549.

Li, W., Kong, F., Li, X., Dai, X., Liu, X., Zheng, Q., Wu, R., Zhou, X., Lu, F., Chang, B., *et al.* (2009). Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. *Mol Vis* 15, 267-275.

Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.C., and Kain, S.R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273, 34970-34975.

Li, X.G., Okada, T., Kodera, M., Nara, Y., Takino, N., Muramatsu, C., Ikeguchi, K., Urano, F., Ichinose, H., Metzger, D., *et al.* (2006). Viral-mediated temporally controlled dopamine production in a rat model of Parkinson disease. *Mol Ther* 13, 160-166.

Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E., and Berns, K.I. (1996a). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11288-11294.

Linden, R.M., Winocour, E., and Berns, K.I. (1996b). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7966-7972.

Liu, X., Brandt, C.R., Gabelt, B.T., Bryar, P.J., Smith, M.E., and Kaufman, P.L. (1999). Herpes simplex virus mediated gene transfer to primate ocular tissues. *Exp Eye Res* 69, 385-395.

Loeb, J.E., Cordier, W.S., Harris, M.E., Weitzman, M.D., and Hope, T.J. (1999). Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 10, 2295-2305.

Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.

Lorenz, B., Gyurus, P., Preising, M., Bremser, D., Gu, S., Andrassi, M., Gerth, C., and Gal, A. (2000). Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2735-2742.

Lorenz, B., Preising, M., and Stieger, K. (2010). Retinal blinding disorders and gene therapy--molecular and clinical aspects. *Curr Gene Ther* 10, 350-370.

Lotery, A.J., Yang, G.S., Mullins, R.F., Russell, S.R., Schmidt, M., Stone, E.M., Lindbloom, J.D., Chiorini, J.A., Kotin, R.M., and Davidson, B.L. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14, 1663-1671.

Lutzko, C., Kruth, S., Abrams-Ogg, A.C., Lau, K., Li, L., Clark, B.R., Ruedy, C., Nanji, S., Foster, R., Kohn, D., *et al.* (1999). Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility in canine alpha-L-iduronidase deficiency. *Blood* 93, 1895-1905.

MacLaren, R.E. (2009). An analysis of retinal gene therapy clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 11, 540-546.

MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20, 971-982.

Maeda, Y., Ikeda, U., Shimpo, M., Ueno, S., Ogasawara, Y., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Saito, T., Colosi, P., *et al.* (1998). Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1341-1348.

Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Ying, G.-s., and Rossi, S. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet* *374*, 1597-1605.

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., *et al.* (2008a). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* *358*, 2240-2248.

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., *et al.* (2008b). Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine* *358*, 2240-2248.

Mancuso, K., Hauswirth, W.W., Li, Q., Connor, T.B., Kuchenbecker, J.A., Mauck, M.C., Neitz, J., and Neitz, M. (2009). Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature* *461*, 784-787.

Mancuso, K., Hendrickson, A.E., Connor, T.B., Jr., Mauck, M.C., Kinsella, J.J., Hauswirth, W.W., Neitz, J., and Neitz, M. (2007). Recombinant adeno-associated virus targets passenger gene expression to cones in primate retina. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* *24*, 1411-1416.

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.

Marchant, A., Appay, V., Van Der Sande, M., Dulphy, N., Liesnard, C., Kidd, M., Kaye, S., Ojuola, O., Gillespie, G.M., Vargas Cuero, A.L., *et al.* (2003). Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* *111*, 1747-1755.

Marks, W.J., Jr., Ostrem, J.L., Verhagen, L., Starr, P.A., Larson, P.S., Bakay, R.A., Taylor, R., Cahn-Weiner, D.A., Stoessl, A.J., Olanow, C.W., *et al.* (2008). Safety and tolerability of intraputamin delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* *7*, 400-408.

Markusic, D.M., Herzog, R.W., Aslanidi, G.V., Hoffman, B.E., Li, B., Li, M., Jayandharan, G.R., Ling, C., Zolotukhin, I., Ma, W., *et al.* (2010). High-efficiency Transduction and Correction of Murine Hemophilia B Using AAV2 Vectors Devoid of Multiple Surface-exposed Tyrosines. *Mol Ther*.

Marmor, M.F. (1999). Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* *97*, 239-249.

Masland, R.H. (1986). The functional architecture of the retina. *Sci Am* *255*, 102-111.

Masland, R.H. (2001a). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* *4*, 877-886.

Masland, R.H. (2001b). Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* *11*, 431-436.

Mast, T.C., Kierstead, L., Gupta, S.B., Nikas, A.A., Kallas, E.G., Novitsky, V., Mbewe, B., Pitisuttithum, P., Schechter, M., Vardas, E., *et al.* (2010). International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* *28*, 950-957.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 599-609.

McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., *et al.* (2008). The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Mol Ther* *16*, 931-941.

McCarty, D.M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* *16*, 1648-1656.

McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* *10*, 2112-2118.

McConnell, M.J., and Imperiale, M.J. (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* *15*, 1022-1033.

McCown, T.J., Xiao, X., Li, J., Breese, G.R., and Samulski, R.J. (1996). Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res* *713*, 99-107.

McKenna, D.J., Simpson, D.A., Feeney, S., Gardiner, T.A., Boyle, C., Nelson, J., and Stitt, A.W. (2001). Expression of the 67 kDa laminin receptor (67LR) during retinal development: correlations with angiogenesis. *Exp Eye Res* *73*, 81-92.

McLaughlin, S.K., Collis, P., Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* *62*, 1963-1973.

McLeod, D.S., Grebe, R., Bhutto, I., Merges, C., Baba, T., and Luty, G.A. (2009). Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 4982-4991.

McVey, D., Hamilton, M.M., Hsu, C., King, C.R., Brough, D.E., and Wei, L.L. (2008). Repeat administration of proteins to the eye with a single intraocular injection of an adenovirus vector. *Mol Ther* 16, 1444-1449.

Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29, 58-69.

Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., and Carey, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249-254.

Metea, M.R., and Newman, E.A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26, 2862-2870.

Michaelides, M., Hardcastle, A.J., Hunt, D.M., and Moore, A.T. (2006). Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Surv Ophthalmol* 51, 232-258.

Michaelides, M., Hunt, D.M., and Moore, A.T. (2004). The cone dysfunction syndromes. *Br J Ophthalmol* 88, 291-297.

Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., *et al.* (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13, 419-422.

Mitchell, A.M., Nicolson, S.C., Warischalk, J.K., and Samulski, R.J. (2010). AAV's Anatomy: Roadmap for Optimizing Vectors for Translational Success. *Curr Gene Ther* 10, 319-340.

Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1997). Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10319-10323.

Molday, R.S., Zhong, M., and Quazi, F. (2009). The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta* 1791, 573-583.

Mole, S.E. (1999). Batten's disease: eight genes and still counting? *Lancet* 354, 443-445.

Monahan, P.E., Lothrop, C.D., Sun, J., Hirsch, M.L., Kafri, T., Kantor, B., Sarkar, R., Tillson, D.M., Elia, J.R., and Samulski, R.J. (2010). Proteasome Inhibitors Enhance Gene Delivery by AAV Virus Vectors Expressing Large Genomes in Hemophilia Mouse and Dog Models: A Strategy for Broad Clinical Application. *Mol Ther*.

Mordenti, J., Cuthbertson, R.A., Ferrara, N., Thomsen, K., Berleau, L., Licko, V., Allen, P.C., Valverde, C.R., Meng, Y.G., Fei, D.T., *et al.* (1999a). Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol* 27, 536-544.

Mordenti, J., Cuthbertson, R.A., Ferrara, N., Thomsen, K., Berleau, L., Licko, V., Allen, P.C., Valverde, C.R., Meng, Y.G., Fei, D.T.W., *et al.* (1999b). Comparisons of the Intraocular Tissue Distribution, Pharmacokinetics, and Safety of 125I-Labeled Full-Length and Fab Antibodies in Rhesus Monkeys Following Intravitreal Administration. *Toxicologic Pathology* 27, 536-544.

Mori, S., Takeuchi, T., Enomoto, Y., Kondo, K., Sato, K., Ono, F., Sata, T., and Kanda, T. (2007). Tissue distribution of cynomolgus adeno-associated viruses AAV10, AAV11, and AAVcy.7 in naturally infected monkeys. *Archives of Virology* 153, 375-380.

Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 330, 375-383.

Morral, N., O'Neal, W., Rice, K., Leland, M., Kaplan, J., Piedra, P.A., Zhou, H., Parks, R.J., Velji, R., Aguilar-Cordova, E., *et al.* (1999). Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12816-12821.

Morris, J.C., Conerly, M., Thomasson, B., Storek, J., Riddell, S.R., and Kiem, H.P. (2004). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses to enhanced green and yellow fluorescent proteins after myeloablative conditioning. *Blood* 103, 492-499.

Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 18, 119-128.

Mowat, F.M., Petersen-Jones, S.M., Williamson, H., Williams, D.L., Luthert, P.J., Ali, R.R., and Bainbridge, J.W. (2008). Topographical characterization of cone photoreceptors and the area centralis of the canine retina. *Mol Vis* 14, 2518-2527.

Mueller, C., and Flotte, T.R. (2008). Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 15, 858-863.

Muller, U. (2008). Cadherins and mechanotransduction by hair cells. *Curr Opin Cell Biol* 20, 557-566.

Nakaizumi, Y. (1964a). The Ultrastructure of Bruch's Membrane. I. Human, Monkey, Rabbit, Guinea Pig, and Rat Eyes. *Arch Ophthalmol* 72, 380-387.

Nakaizumi, Y. (1964b). The Ultrastructure of Bruch's Membrane. II. Eyes with a Tapetum. *Arch Ophthalmol* 72, 388-394.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Narfstrom, K., Katz, M.L., Bragadottir, R., Seeliger, M., Boulanger, A., Redmond, T.M., Caro, L., Lai, C.M., and Rakoczy, P.E. (2003). Functional and structural recovery of the retina after gene therapy in the RPE65 null mutation dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1663-1672.

Narfstrom, K., Wrigstad, A., and Nilsson, S.E. (1989). The Briard dog: a new animal model of congenital stationary night blindness. *Br J Ophthalmol* 73, 750-756.

Nathwani, A.C., Gray, J.T., Ng, C.Y., Zhou, J., Spence, Y., Waddington, S.N., Tuddenham, E.G., Kemball-Cook, G., McIntosh, J., Boon-Spijker, M., *et al.* (2006). Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107, 2653-2661.

Natkunarahaj, M., Trittibach, P., McIntosh, J., Duran, Y., Barker, S.E., Smith, A.J., Nathwani, A.C., and Ali, R.R. (2007). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Therapy* 15, 463-467.

Nayak, S., and Herzog, R.W. (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Ther* 17, 295-304.

Newman, E.A. (1994). A physiological measure of carbonic anhydrase in Muller cells. *Glia* 11, 291-299.

Newsome, D.A., Fletcher, R.T., and Chader, G.J. (1980). Cyclic nucleotides vary by area in the retina and pigmented epithelium of the human and monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19, 864-869.

Nickla, D.L., and Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* 29, 144-168.

Nicoletti, A., Kawase, K., and Thompson, D.A. (1998). Promoter analysis of RPE65, the gene encoding a 61-kDa retinal pigment epithelium-specific protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 637-644.

Niederhorn, J.Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature Immunology* 7, 354-359.

Niemeyer, G.P., Herzog, R.W., Mount, J., Arruda, V.R., Tillson, D.M., Hathcock, J., van Ginkel, F.W., High, K.A., and Lothrop, C.D. (2008). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113, 797-806.

Nisole, S., and Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 1, 9.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.

Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S., and Berman, S. (1966). Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5, 450-473.

O'Reilly, M., Palfi, A., Chadderton, N., Millington-Ward, S., Ader, M., Cronin, T., Tuohy, T., Auricchio, A., Hildinger, M., Tivnan, A., *et al.* (2007). RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 81, 127-135.

Ollivier, F.J., Samuelson, D.A., Brooks, D.E., Lewis, P.A., Kallberg, M.E., and Komaromy, A.M. (2004). Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Vet Ophthalmol* 7, 11-22.

Opie, S.R., Warrington, K.H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S., and Muzyczka, N. (2003). Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol* 77, 6995-7006.

Orr, H.T., Lowry, O.H., Cohen, A.I., and Ferrendelli, J.A. (1976). Distribution of 3':5'-cyclic AMP and 3':5'-cyclic GMP in rabbit retina in vivo: selective effects of dark and light adaptation and ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4442-4445.

Oshima, Y., Takahashi, K., Oshima, S., Saishin, Y., Silva, R.L., Liang, X., Reddy, P.S., Ganesh, S., Brann, T., Liu, G., *et al.* (2004). Intraocular gutless adenoviral-vectored VEGF stimulates anterior segment but not retinal neovascularization. *J Cell Physiol* 199, 399-411.

Osorio, D., and Vorobyev, M. (2008). A review of the evolution of animal colour vision and visual communication signals. *Vision Res* 48, 2042-2051.

Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* **12**, 401-409.

Oyster, C.W., Takahashi, E., and Collewijn, H. (1972). Direction-selective retinal ganglion cells and control of optokinetic nystagmus in the rabbit. *Vision Res* **12**, 183-193.

Pang, J., Boye, S.E., Lei, B., Boye, S.L., Everhart, D., Ryals, R., Umino, Y., Rohrer, B., Alexander, J., Li, J., *et al.* (2010). Self-complementary AAV-mediated gene therapy restores cone function and prevents cone degeneration in two models of Rpe65 deficiency. *Gene Therapy* **17**, 815-826.

Pang, J., Chang, B., Kumar, A., Nusinowitz, S., Noorwez, S., Li, J., Rani, A., Foster, T., Chiodo, V., and Doyle, T. (2006). Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis. *Molecular Therapy* **13**, 565-572.

Paquet-Durand, F., Hauck, S.M., van Veen, T., Ueffing, M., and Ekstrom, P. (2009). PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *J Neurochem* **108**, 796-810.

Parisi, M.A. (2009). Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **151C**, 326-340.

Park, T.G., Jeong, J.H., and Kim, S.W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 467-486.

Park, T.K., Wu, Z., Kjellstrom, S., Zeng, Y., Bush, R.A., Sieving, P.A., and Colosi, P. (2009). Intravitreal delivery of AAV8 retinoschisin results in cell type-specific gene expression and retinal rescue in the Rs1-KO mouse. *Gene Ther* **16**, 916-926.

Parrish, C.R. (2010). Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. **2100**, 149-176.

Parry, H.B. (1953). Degenerations of the dog retina. III. Retinopathy secondary to glaucoma. *Br J Ophthalmol* **37**, 670-679.

Parver, L.M., Auker, C., and Carpenter, D.O. (1980). Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. *Am J Ophthalmol* **89**, 641-646.

Passini, M.A. (2006). Intracranial Delivery of CLN2 Reduces Brain Pathology in a Mouse Model of Classical Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Journal of Neuroscience* **26**, 1334-1342.

Peden, C.S., Manfredsson, F.P., Reimsnider, S.K., Poirier, A.E., Burger, C., Muzyczka, N., and Mandel, R.J. (2009). Striatal readministration of rAAV vectors reveals an immune response against AAV2 capsids that can be circumvented. *Mol Ther* **17**, 524-537.

Penfold, P.L., Provis, J.M., and Liew, S.C. (1993). Human retinal microglia express phenotypic characteristics in common with dendritic antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol* **45**, 183-191.

Persons, D.A. (2010). Lentiviral Vector Gene Therapy: Effective and Safe? *Molecular Therapy* **18**, 861-862.

Petersen-Jones, S.M., Bartoe, J.T., Fischer, A.J., Scott, M., Boye, S.L., Chiodo, V., and Hauswirth, W.W. (2009). AAV retinal transduction in a large animal model species: comparison of a self-complementary AAV2/5 with a single-stranded AAV2/5 vector. *Mol Vis* **15**, 1835-1842.

Petrus-Silva, H., Dinculescu, A., Li, Q., Min, S.-H., Chiodo, V., Pang, J.-J., Zhong, L., Zolotukhin, S., Srivastava, A., Lewin, A.S., *et al.* (2008). High-efficiency Transduction of the Mouse Retina by Tyrosine-mutant AAV Serotype Vectors. *Molecular Therapy* **17**, 463-471.

Petrus-Silva, H., Dinculescu, A., Li, Q., Min, S.H., Chiodo, V., Pang, J.J., Zhong, L., Zolotukhin, S., Srivastava, A., Lewin, A.S., *et al.* (2009). High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther* **17**, 463-471.

Peyman, G.A., Spitznas, M., and Straatsma, B.R. (1971). Peroxidase diffusion in the normal and photocoagulated retina. *Invest Ophthalmol* **10**, 181-189.

Pham, D.H., Moretti, P.A., Goodall, G.J., and Pitson, S.M. (2008). Attenuation of leakiness in doxycycline-inducible expression via incorporation of 3' AU-rich mRNA destabilizing elements. *BioTechniques* **45**, 155-156, 158, 160 passim.

Philp, N.J., Wang, D., Yoon, H., and Hjelmeland, L.M. (2003). Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1716-1721.

Piedra, P.A., Poveda, G.A., Ramsey, B., McCoy, K., and Hiatt, P.W. (1998). Incidence and prevalence of neutralizing antibodies to the common adenoviruses in children with cystic fibrosis: implication for gene therapy with adenovirus vectors. *Pediatrics* **101**, 1013-1019.

Pierson, T.C., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2002). Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 76, 4138-4144.

Pilz, R.B., and Casteel, D.E. (2003). Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93, 1034-1046.

Pino, R.M., and Essner, E. (1981). Permeability of rat choriocapillaris to hemeproteins. Restriction of tracers by a fenestrated endothelium. *J Histochem Cytochem* 29, 281-290.

Pino, R.M., Essner, E., and Pino, L.C. (1982). Permeability of the neonatal rat choriocapillaris to hemeproteins and ferritin. *Am J Anat* 164, 333-341.

Plskova, J., Holan, V., Filipec, M., and Forrester, J.V. (2004). Lymph node removal enhances corneal graft survival in mice at high risk of rejection. *BMC Ophthalmol* 4, 3.

Poll-The, B.T., Maillette de Buy Wenniger-Prick, L.J., Barth, P.G., and Duran, M. (2003). The eye as a window to inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 26, 229-244.

Ponder, K.P. (2007). Immunology of neonatal gene transfer. *Curr Gene Ther* 7, 403-410.

Ponder, K.P., Wang, B., Wang, P., Ma, X., Herati, R., Cullen, K., O'Donnell, P., Ellinwood, N.M., Traas, A., Primeau, T.M., *et al.* (2006). Mucopolysaccharidosis I cats mount a cytotoxic T lymphocyte response after neonatal gene therapy that can be blocked with CTLA4-Ig. *Mol Ther* 14, 5-13.

Poukens, V., Glasgow, B.J., and Demer, J.L. (1998). Nonvascular contractile cells in sclera and choroid of humans and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1765-1774.

Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 156-160.

Priller, J., Flugel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C.A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B.A., *et al.* (2001). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7, 1356-1361.

Provis, J.M. (2001). Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20, 799-821.

Provost, N., Le Meur, G., Weber, M., Mendes-Madeira, A., Podevin, G., Chereil, Y., Colle, M.A., Deschamps, J.Y., Moullier, P., and Rolling, F. (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* 11, 275-283.

Qasim, W., Gaspar, H.B., and Thrasher, A.J. (2009). Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Gene Ther* 16, 1285-1291.

Quinlan, R., Tobin, J., and Beales, P. (2008). Chapter 5 Modeling Ciliopathies Primary Cilia in Development and Disease. 84, 249-310.

Quinn, R.H., and Miller, S.S. (1992). Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 3513-3527.

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 76, 791-801.

Rajappa, M., Goyal, A., and Kaur, J. (2010). Inherited metabolic disorders involving the eye: a clinico-biochemical perspective. *Eye (Lond)* 24, 507-518.

Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.P., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80, 148-158.

Raper, S.E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G.P., Nunes, F., Haskal, Z.J., Furth, E.E., Propert, K.J., Robinson, M.B., Magosin, S., *et al.* (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* 13, 163-175.

Rapola, J., and Haltia, M. (1973). Cytoplasmic inclusions in the vermiform appendix and skeletal muscle in two types of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* 96, 833-840.

Rattner, A., Toulabi, L., Williams, J., Yu, H., and Nathans, J. (2008). The genomic response of the retinal pigment epithelium to light damage and retinal detachment. *J Neurosci* 28, 9880-9889.

Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J.X., Crouch, R.K., and Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20, 344-351.

Reichel, M.B., Ali, R.R., Thrasher, A.J., Hunt, D.M., Bhattacharya, S.S., and Baker, D. (1998). Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Ther* 5, 1038-1046.

Rein, D.T., Breidenbach, M., and Curiel, D.T. (2006). Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol* 2, 137-143.

Rider, J.A., and Rider, D.L. (1988). Batten disease: past, present, and future. *Am J Med Genet Suppl* 5, 21-26.

Rizzolo, L.J. (2007). Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 258, 195-234.

Robertson, M.J., Erwig, L.P., Liversidge, J., Forrester, J.V., Rees, A.J., and Dick, A.D. (2002). Retinal microenvironment controls resident and infiltrating macrophage function during uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2250-2257.

Rodrigues, T., Carrondo, M.J., Alves, P.M., and Cruz, P.E. (2007). Purification of retroviral vectors for clinical application: biological implications and technological challenges. *J Biotechnol* 127, 520-541.

Rollag, M.D., Berson, D.M., and Provencio, I. (2003). Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 18, 227-234.

Rolling, F., Shen, W.Y., Tabarias, H., Constable, I., Kanagasingam, Y., Barry, C.J., and Rakoczy, P.E. (1999). Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography. *Hum Gene Ther* 10, 641-648.

Romano, C., and Hicks, D. (2007). Adult retinal neuronal cell culture. *Prog Retin Eye Res* 26, 379-397.

Rooryck, C., and Lacombe, D. (2008). [Bardet-Biedl syndrome]. *Ann Endocrinol (Paris)* 69, 463-471.

Roque, R.S., Imperial, C.J., and Caldwell, R.B. (1996). Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 196-203.

Ryan, D.A., and Federoff, H.J. (2009). Immune responses to herpesviral vectors. *Hum Gene Ther* 20, 434-441.

Ryan, S.J. (2006). *Retina*, 4th edn (Philadelphia, Elsevier/Mosby).

Saihan, Z., Webster, A.R., Luxon, L., and Bitner-Glindzicz, M. (2009). Update on Usher syndrome. *Curr Opin Neurol* 22, 19-27.

Salem, H.K., Ranjzad, P., Driessen, A., Appleby, C.E., Heagerty, A.M., and Kingston, P.A. (2006). Beta-adrenoceptor blockade markedly attenuates transgene expression from cytomegalovirus promoters within the cardiovascular system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2267-2274.

Salveti, A., Oreve, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J., and Moullier, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 9, 695-706.

Samoylova, T.I., and Smith, B.F. (1999). Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening. *Muscle Nerve* 22, 460-466.

Sands, M.S., and Davidson, B.L. (2006). Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol Ther* 13, 839-849.

Sands, W.A., and Palmer, T.M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 20, 460-466.

Sanes, J.R., and Zipursky, S.L. (2010). Design principles of insect and vertebrate visual systems. *Neuron* 66, 15-36.

Santos, K., Duke, C.M., and Dewhurst, S. (2006). Amplicons as vaccine vectors. *Curr Gene Ther* 6, 383-392.

Satir, P., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2010). The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science* 123, 499-503.

Scallan, C.D., Jiang, H., Liu, T., Patarroyo-White, S., Sommer, J.M., Zhou, S., Couto, L.B., and Pierce, G.F. (2006). Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 107, 1810-1817.

Schapira, A. (2006a). Mitochondrial disease. *The Lancet* 368, 70-82.

Schapira, A.H. (2006b). Mitochondrial disease. *Lancet* 368, 70-82.

Schapira, M., Raaka, B.M., Samuels, H.H., and Abagyan, R. (2000). Rational discovery of novel nuclear hormone receptor antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1008-1013.

Schiedner, G., Bloch, W., Hertel, S., Johnston, M., Molojavyi, A., Dries, V., Varga, G., Van Rooijen, N., and Kochanek, S. (2003). A hemodynamic response to intravenous adenovirus vector particles is caused by systemic Kupffer cell-mediated activation of endothelial cells. *Hum Gene Ther* 14, 1631-1641.

Schiffmann, R., Murray, G.J., Treco, D., Daniel, P., Sellos-Moura, M., Myers, M., Quirk, J.M., Zirzow, G.C., Borowski, M., Loveday, K., *et al.* (2000). Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 365-370.

Schmidt, M., Grot, E., Cervenka, P., Wainer, S., Buck, C., and Chiorini, J.A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 80, 5082-5085.

Schnapf, J.L., Kraft, T.W., and Baylor, D.A. (1987). Spectral sensitivity of human cone photoreceptors. *Nature* 325, 439-441.

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.

Schuetz, E., and Thanos, S. (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 5, 619-627.

Schultz, B.R., and Chamberlain, J.S. (2008). Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther* 16, 1189-1199.

Scriver, C.R. (2008). Garrod's Croonian Lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *J Inher Metab Dis* 31, 580-598.

Seiler, M.P., Cerullo, V., and Lee, B. (2007). Immune response to helper dependent adenoviral mediated liver gene therapy: challenges and prospects. *Curr Gene Ther* 7, 297-305.

Seisenberger, G., Ried, M.U., Endress, T., Buning, H., Hallek, M., and Brauchle, C. (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* 294, 1929-1932.

Sen, H.A., and Campochiaro, P.A. (1991). Stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation causes breakdown of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 2006-2010.

Seow, Y., and Wood, M.J. (2009). Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther* 17, 767-777.

Sharma, A., Li, X., Bangari, D.S., and Mittal, S.K. (2009). Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res* 143, 184-194.

Sharma, A., Tovey, J.C., Ghosh, A., and Mohan, R.R. (2010). AAV serotype influences gene transfer in corneal stroma in vivo. *Exp Eye Res* 91, 440-448.

Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-861.

Shen, S., Wiemelt, A.P., McMorris, F.A., and Barres, B.A. (1999). Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 23, 285-295.

Shen, Y., and Nemunaitis, J. (2006). Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 13, 975-992.

Shi, L., Ko, M.L., and Ko, G.Y. (2009). Rhythmic expression of microRNA-26a regulates the L-type voltage-gated calcium channel alpha1C subunit in chicken cone photoreceptors. *J Biol Chem* 284, 25791-25803.

Shimomura, Y., Hirata, A., Ishikawa, S., and Okinami, S. (2009). Changes in choriocapillaris fenestration of rat eyes after intravitreal bevacizumab injection. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247, 1089-1094.

Shull, R., Lu, X., Dube, I., Lutzko, C., Kruth, S., Abrams-Ogg, A., Kiem, H.P., Goehle, S., Schuening, F., Millan, C., *et al.* (1996a). Humoral immune response limits gene therapy in canine MPS I. *Blood* 88, 377-379.

Shull, R.M., Lu, X., McEntee, M.F., Bright, R.M., Pepper, K.A., and Kohn, D.B. (1996b). Myoblast gene therapy in canine mucopolysaccharidosis. I: Abrogation by an immune response to alpha-L-iduronidase. *Hum Gene Ther* 7, 1595-1603.

Siegrist, C.A. (2001). Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* 19, 3331-3346.

Simonelli, F., Maguire, A.M., Testa, F., Pierce, E.A., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., *et al.* (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* 18, 643-650.

Simunovic, M.P. (2010). Colour vision deficiency. *Eye (Lond)* 24, 747-755.

Sinclair, J., and Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87, 1763-1779.

Sipo, I., Fechner, H., Pinkert, S., Suckau, L., Wang, X., Weger, S., and Poller, W. (2007). Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. *Gene Ther* 14, 1319-1329.

Sleat, D.E., Wiseman, J.A., El-Banna, M., Kim, K.H., Mao, Q., Price, S., Macauley, S.L., Sidman, R.L., Shen, M.M., Zhao, Q., *et al.* (2004). A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 24, 9117-9126.

Smith, A.J., Schlichtenbrede, F.C., Tschernutter, M., Bainbridge, J.W., Thrasher, A.J., and Ali, R.R. (2003). AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 8, 188-195.

Smith, J.J., Baum, D.A., and Moore, A. (2009). The need for molecular genetic perspectives in evolutionary education (and vice versa). *Trends Genet* 25, 427-429.

Smith, J.R., Verwaerde, C., Rolling, F., Naud, M.C., Delanoye, A., Thillaye-Goldenberg, B., Apparailly, F., and De Kozak, Y. (2005). Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum Gene Ther* 16, 1037-1046.

Smith, J.S., and Robinson, N.J. (2002). Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* 186 Suppl 1, S3-28.

Smith, R.H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15, 817-822.

Smith, R.S., and Rudt, L.A. (1975). Ocular vascular and epithelial barriers to microperoxidase. *Invest Ophthalmol* 14, 556-560.

Snyder, R.O., and Flotte, T.R. (2002). Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* 13, 418-423.

Snyder, R.O., Miao, C.H., Patijn, G.A., Spratt, S.K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A.M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L.K., *et al.* (1997). Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16, 270-276.

Sommerfelt, M.A. (1999). Retrovirus receptors. *J Gen Virol* 80 (Pt 12), 3049-3064.

Sondhi, D., Hackett, N.R., Peterson, D.A., Stratton, J., Baad, M., Travis, K.M., Wilson, J.M., and Crystal, R.G. (2007). Enhanced survival of the LINCL mouse following CLN2 gene transfer using the rh.10 rhesus macaque-derived adeno-associated virus vector. *Mol Ther* 15, 481-491.

Sondhi, D., Peterson, D.A., Edelstein, A.M., del Fierro, K., Hackett, N.R., and Crystal, R.G. (2008). Survival advantage of neonatal CNS gene transfer for late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Exp Neurol* 213, 18-27.

Sondhi, D., Peterson, D.A., Giannaris, E.L., Sanders, C.T., Mendez, B.S., De, B., Rostkowski, A.B., Blanchard, B., Bjugstad, K., Sladek, J.R., Jr., *et al.* (2005). AAV2-mediated CLN2 gene transfer to rodent and non-human primate brain results in long-term TPP-I expression compatible with therapy for LINCL. *Gene Ther* 12, 1618-1632.

Sonoda, S., Spee, C., Barron, E., Ryan, S.J., Kannan, R., and Hinton, D.R. (2009). A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc* 4, 662-673.

Soper, B.W., Lessard, M.D., Vogler, C.A., Levy, B., Beamer, W.G., Sly, W.S., and Barker, J.E. (2001). Nonablative neonatal marrow transplantation attenuates functional and physical defects of beta-glucuronidase deficiency. *Blood* 97, 1498-1504.

Spencer, B., Agarwala, S., Miskulin, M., Smith, M., and Brandt, C.R. (2000). Herpes simplex virus-mediated gene delivery to the rodent visual system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1392-1401.

Srivastava, A., Lusby, E.W., and Berns, K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45, 555-564.

Steinfeld, R., Heim, P., von Gregory, H., Meyer, K., Ullrich, K., Goebel, H.H., and Kohlschütter, A. (2002). Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: quantitative description of the clinical course in patients with CLN2 mutations. *Am J Med Genet* 112, 347-354.

Steuer, H., Jaworski, A., Elger, B., Kausmann, M., Keldenich, J., Schneider, H., Stoll, D., and Schlosshauer, B. (2005). Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 1047-1053.

Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P., and Rolling, F. (2009a). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev* 61, 527-541.

Stieger, K., Chauveau, C., and Rolling, F. (2010). Preclinical studies on specific gene therapy for recessive retinal degenerative diseases. *Curr Gene Ther* 10, 389-403.

Stieger, K., Colle, M.A., Dubreil, L., Mendes-Madeira, A., Weber, M., Le Meur, G., Deschamps, J.Y., Provost, N., Nivard, D., Cherel, Y., *et al.* (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 16, 916-923.

Stieger, K., Le Meur, G., Lasne, F., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Martin, L., Moullier, P., *et al.* (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., Lheriteau, E., Moullier, P., and Rolling, F. (2009b). AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR J* 50, 206-224.

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.

Stitt, A.W., McKenna, D., Simpson, D.A., Gardiner, T.A., Harriott, P., Archer, D.B., and Nelson, J. (1998). The 67-kd laminin receptor is preferentially expressed by proliferating retinal vessels in a murine model of ischemic retinopathy. *Am J Pathol* *152*, 1359-1365.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., and Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* *15*, 4738-4747.

Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* *3*, 879-889.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2003). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* *316*, 267-280.

Summers, C.G. (2009). Albinism: classification, clinical characteristics, and recent findings. *Optom Vis Sci* *86*, 659-662.

Sun, X., Pawlyk, B., Xu, X., Liu, X., Bulgakov, O.V., Adamian, M., Sandberg, M.A., Khani, S.C., Tan, M.H., Smith, A.J., *et al.* (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther* *17*, 117-131.

Surace, E.M., and Auricchio, A. (2008). Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Res* *48*, 353-359.

Surace, E.M., Auricchio, A., Reich, S.J., Rex, T., Glover, E., Pineles, S., Tang, W., O'Connor, E., Lyubarsky, A., Savchenko, A., *et al.* (2003). Delivery of adeno-associated virus vectors to the fetal retina: impact of viral capsid proteins on retinal neuronal progenitor transduction. *J Virol* *77*, 7957-7963.

Sweigard, J.H., Cashman, S.M., and Kumar-Singh, R. (2010). Adenovirus vectors targeting distinct cell types in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *51*, 2219-2228.

Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Connors, D.G., El-Naggar, A.K., Fossella, F., Glisson, B.S., *et al.* (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* *91*, 763-771.

Tan, M.H., Smith, A.J., Pawlyk, B., Xu, X., Liu, X., Bainbridge, J.B., Basche, M., McIntosh, J., Tran, H.V., Nathwani, A., *et al.* (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete *Aipl1* deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet* *18*, 2099-2114.

Taylor, A.W. (2009). Ocular immune privilege. *Eye (Lond)* *23*, 1885-1889.

Taylor, T.J., Brockman, M.A., McNamee, E.E., and Knipe, D.M. (2002). Herpes simplex virus. *Front Biosci* *7*, d752-764.

Thanos, S., Moore, S., and Hong, Y. (1996). Retinal microglia. *Progress in Retinal and Eye Research* *15*, 331-361.

Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2000). Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 7482-7487.

Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2001). Preexisting antiadenoviral immunity is not a barrier to efficient and stable transduction of the brain, mediated by novel high-capacity adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* *12*, 839-846.

Thomas, C.E., Storm, T.A., Huang, Z., and Kay, M.A. (2004). Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* *78*, 3110-3122.

Thorner, A.R., Vogels, R., Kaspers, J., Weverling, G.J., Holterman, L., Lemckert, A.A., Dilraj, A., McNally, L.M., Jeena, P.M., Jepsen, S., *et al.* (2006). Age dependence of adenovirus-specific neutralizing antibody titers in individuals from sub-Saharan Africa. *J Clin Microbiol* *44*, 3781-3783.

Tian, J., Xu, Z., Smith, J.S., Hofherr, S.E., Barry, M.A., and Byrnes, A.P. (2009). Adenovirus activates complement by distinctly different mechanisms in vitro and in vivo: indirect complement activation by virions in vivo. *J Virol* *83*, 5648-5658.

Toietta, G., Mane, V.P., Norona, W.S., Finegold, M.J., Ng, P., McDonagh, A.F., Beaudet, A.L., and Lee, B. (2005). Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3930-3935.

Toromanoff, A., Adjali, O., Larcher, T., Hill, M., Guigand, L., Chenuaud, P., Deschamps, J.Y., Gauthier, O., Blancho, G., Vanhove, B., *et al.* (2010). Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* *18*, 151-160.

Toussaint, D., Kuwabara, T., and Cogan, D.G. (1961). Retinal vascular patterns. II. Human retinal vessels studied in three dimensions. *Arch Ophthalmol* *65*, 575-581.

Traas, A.M., Wang, P., Ma, X., Tittiger, M., Schaller, L., O'Donnell, P., Sleeper, M.M., Vite, C., Herati, R., Aguirre, G.D., *et al.* (2007). Correction of clinical manifestations of canine mucopolysaccharidosis I with neonatal retroviral vector gene therapy. *Mol Ther* *15*, 1423-1431.

Vardas, E., Kaleebu, P., Bekker, L.G., Hoosen, A., Chomba, E., Johnson, P.R., Anklesaria, P., Birungi, J., Barin, B., Boaz, M., *et al.* (2010). A phase 2 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 vaccine based on adeno-associated virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* *26*, 933-942.

Vetrini, F., Auricchio, A., Du, J., Angeletti, B., Fisher, D.E., Ballabio, A., and Marigo, V. (2004). The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Mol Cell Biol* *24*, 6550-6559.

Vogt, V.M., and Simon, M.N. (1999). Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J Virol* *73*, 7050-7055.

Wagner, A.M., Schoeberlein, A., and Surbek, D. (2009). Fetal gene therapy: opportunities and risks. *Adv Drug Deliv Rev* *61*, 813-821.

Waldman, Y.Y., Tuller, T., Shlomi, T., Sharan, R., and Ruppin, E. (2010). Translation efficiency in humans: tissue specificity, global optimization and differences between developmental stages. *Nucleic Acids Res* *38*, 2964-2974.

Wang, Z., Ma, H.I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X. (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* *10*, 2105-2111.

Warrington, K.H., Jr., and Herzog, R.W. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* *119*, 571-603.

Watanabe, D. (2010). Medical application of herpes simplex virus. *J Dermatol Sci* *57*, 75-82.

Weber, M., Rabinowitz, J., Provost, N., Conrath, H., Folliot, S., Briot, D., Cherel, Y., Chenuaud, P., Samulski, J., Moullier, P., *et al.* (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* *7*, 774-781.

Weinstein, D.A., Correia, C.E., Conlon, T., Specht, A., Verstegen, J., Onclin-Verstegen, K., Campbell-Thompson, M., Dhaliwal, G., Mirian, L., Cossette, H., *et al.* (2010). Adeno-associated virus-mediated correction of a canine model of glycogen storage disease type Ia. *Hum Gene Ther* *21*, 903-910.

Weiss, R.A. (1996). Retrovirus classification and cell interactions. *J Antimicrob Chemother* *37 Suppl B*, 1-11.

Wells, D.J. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* *11*, 1363-1369.

West, E.L., Pearson, R.A., Tschernutter, M., Sowden, J.C., MacLaren, R.E., and Ali, R.R. (2008). Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors. *Exp Eye Res* *86*, 601-611.

West, L.J. (2002). Defining critical windows in the development of the human immune system. *Hum Exp Toxicol* *21*, 499-505.

Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* *357*, 1513-1518.

Willardson, B.M., Wilkins, J.F., Yoshida, T., and Bitensky, M.W. (1996). Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca²⁺/calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1475-1479.

Wilson, J.H., and Wensel, T.G. (2003). The nature of dominant mutations of rhodopsin and implications for gene therapy. *Mol Neurobiol* *28*, 149-158.

Worgall, S., Sondhi, D., Hackett, N.R., Kosofsky, B., Kekatpure, M.V., Neyzi, N., Dyke, J.P., Ballon, D., Heier, L., Greenwald, B.M., *et al.* (2008). Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther* *19*, 463-474.

Wu, Z., Sun, J., Zhang, T., Yin, C., Yin, F., Van Dyke, T., Samulski, R.J., and Monahan, P.E. (2008). Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther* 16, 280-289.

Wu, Z., Yang, H., and Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther* 18, 80-86.

Xu, H., Chen, M., Reid, D.M., and Forrester, J.V. (2007). LYVE-1-positive macrophages are present in normal murine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 2162-2171.

Xu, S. (2009). microRNA expression in the eyes and their significance in relation to functions. *Prog Retin Eye Res* 28, 87-116.

Yamada, M., Lewis, J.A., and Grodzicker, T. (1985). Overproduction of the protein product of a nonselected foreign gene carried by an adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3567-3571.

Yanez-Munoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., *et al.* (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 12, 348-353.

Yang, G.S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J.D., Harding, T.C., Donahue, B.A., Engelhardt, J.F., Kotin, R., and Davidson, B.L. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 76, 7651-7660.

Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.

Yau, K.W., and Hardie, R.C. (2009). Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139, 246-264.

Yew, N.S., Wysokenski, D.M., Wang, K.X., Ziegler, R.J., Marshall, J., McNeilly, D., Cherry, M., Osburn, W., and Cheng, S.H. (1997). Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum Gene Ther* 8, 575-584.

Yokoi, K., Kachi, S., Zhang, H.S., Gregory, P.D., Spratt, S.K., Samulski, R.J., and Campochiaro, P.A. (2007). Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3324-3328.

Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2001). A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron* 30, 771-780.

Young, J.E., Vogt, T., Gross, K.W., and Khani, S.C. (2003). A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4076-4085.

Yu, C.Y., Yuan, Z., Cao, Z., Wang, B., Qiao, C., Li, J., and Xiao, X. (2009). A muscle-targeting peptide displayed on AAV2 improves muscle tropism on systemic delivery. *Gene Ther* 16, 953-962.

Yu, T.Y., Acosta, M.L., Ready, S., Cheong, Y.L., and Kalloniatis, M. (2007). Light exposure causes functional changes in the retina: increased photoreceptor cation channel permeability, photoreceptor apoptosis, and altered retinal metabolic function. *J Neurochem* 103, 714-724.

Yu, Y., and Bradley, A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat Rev Genet* 2, 780-790.

Yue, Y., Ghosh, A., Long, C., Bostick, B., Smith, B.F., Kornegay, J.N., and Duan, D. (2008). A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol Ther* 16, 1944-1952.

Zack, D.J., Bennett, J., Wang, Y., Davenport, C., Klaunberg, B., Gearhart, J., and Nathans, J. (1991). Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-lacZ fusion gene expression in transgenic mouse retinas. *Neuron* 6, 187-199.

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.

Zeng, H.Y., Zhu, X.A., Zhang, C., Yang, L.P., Wu, L.M., and Tso, M.O. (2005). Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2992-2999.

Zhang, J., Wu, G.S., Ishimoto, S., Pararajasegaram, G., and Rao, N.A. (1997). Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1848-1857.

Zhang, X., and Cote, R.H. (2005). cGMP signaling in vertebrate retinal photoreceptor cells. *Front Biosci* 10, 1191-1204.

- Zhang, X., De Alwis, M., Hart, S.L., Fitzke, F.W., Inglis, S.C., Bournsnel, M.E., Levinsky, R.J., Kinnon, C., Ali, R.R., and Thrasher, A.J. (1999). High-titer recombinant adeno-associated virus production from replicating amplicons and herpes vectors deleted for glycoprotein H. *Hum Gene Ther* *10*, 2527-2537.
- Zhang, X., Feng, Q., and Cote, R.H. (2005). Efficacy and selectivity of phosphodiesterase-targeted drugs in inhibiting photoreceptor phosphodiesterase (PDE6) in retinal photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *46*, 3060-3066.
- Zheng, Y., Rozengurt, N., Ryazantsev, S., Kohn, D.B., Satake, N., and Neufeld, E.F. (2003). Treatment of the mouse model of mucopolysaccharidosis I with retrovirally transduced bone marrow. *Mol Genet Metab* *79*, 233-244.
- Zheng, Y., Ryazantsev, S., Ohmi, K., Zhao, H.Z., Rozengurt, N., Kohn, D.B., and Neufeld, E.F. (2004). Retrovirally transduced bone marrow has a therapeutic effect on brain in the mouse model of mucopolysaccharidosis IIIB. *Mol Genet Metab* *82*, 286-295.
- Zhong, L., Zhao, W., Wu, J., Li, B., Zolotukhin, S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Srivastava, A. (2007). A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Mol Ther* *15*, 1323-1330.
- Zhou, Z.H., Dougherty, M., Jakana, J., He, J., Rixon, F.J., and Chiu, W. (2000). Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* *288*, 877-880.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* *119*, 2388-2398.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy* *16*, 1073-1080.
- Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* *57*, 178-201.
- 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.

Annexe 1

Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates.

Knut Stieger^{1,2}, Josef Schroeder, Nathalie Provost¹, Alexandra Mendes-Madeira¹, Brahim Belbellaa¹, Guylène Le Meur⁴, Michel Weber⁴, Jack-Yves Deschamps⁵, Birgit Lorenz², Philippe Moullier¹ and Fabienne Rolling¹. *Molecular Therapy*, 2009, vol. 17 no. 3 p516–523.

¹INSERM U649, CHU-Hotel Dieu, Nantes, France.

²Department of Ophthalmology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany.

³Institute of Pathology, Central EM-Lab, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

⁴CHU-Hotel Dieu, Service d'Ophtalmologie, Nantes, France.

⁵Ecole Nationale Vétérinaire, Service d'Urgences, Nantes, France.

Detection of Intact rAAV Particles up to 6 Years After Successful Gene Transfer in the Retina of Dogs and Primates

Knut Stieger^{1,2}, Josef Schroeder³, Nathalie Provost¹, Alexandra Mendes-Madeira¹, Brahim Belbellaa¹, Guylène Le Meur⁴, Michel Weber⁴, Jack-Yves Deschamps⁵, Birgit Lorenz², Philippe Moullier¹ and Fabienne Rolling¹

¹INSERM U649, CHU-Hotel Dieu, Nantes, France; ²Department of Ophthalmology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany;

³Institute of Pathology, Central EM-Lab, University of Regensburg, Regensburg, Germany; ⁴CHU-Hotel Dieu, Service d'Ophthalmologie, Nantes, France;

⁵Ecole Nationale Vétérinaire, Service d'Urgences, Nantes, France

Gene transfer to the retina using recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors has proven to be an effective option for the treatment of retinal degenerative diseases in several animal models and has recently advanced into clinical trials in humans. To date, intracellular trafficking of AAV vectors and subsequent capsid degradation has been studied only *in vitro*, but the fate of AAV particles in transduced cells following subretinal injection has yet to be elucidated. Using electron microscopy and western blot, we analyzed retinas of one primate and four dogs that had been subretinally injected with AAV2/4, -2/5, or -2/2 serotypes and that displayed efficient gene transfer over several years. We show that intact AAV particles are still present in retinal cells, for up to 6 years after successful gene transfer in these large animals. The persistence of intact vector particles in the target organ, several years postadministration, is totally unexpected and, therefore, represents a new and unanticipated safety issue to consider at a time when gene therapy clinical trials raise new immunological concerns.

Received 31 July 2008; accepted 22 November 2008; advance online publication 23 December 2008. doi:10.1038/mt.2008.283

INTRODUCTION

Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors, which are among the most efficient vehicles for prolonged gene transfer, have been used to deliver therapeutic genes to correct defects in animal models of various human disorders. Proof of principle for gene replacement therapy using rAAV in several animal models of retinal degeneration, including the RPE65^{-/-} dogs,¹⁻³ has been shown, and the first clinical trials for this type of therapy has recently started in the United Kingdom and in the United States.⁴⁻⁶

The manner by which AAVs enter and persist in host cells has been extensively studied *in vitro*, and can be divided into several steps, including cellular uptake, endosomal trafficking, endosomal escape, capsid degradation, and nuclear transfer of viral DNA.

AAV particles interact with the cell surface in a receptor-mediated fashion. These receptors are serotype specific and can be omnipresent or specific for a certain cell type. The main receptor for AAV2 is heparan sulfate proteoglycan, which is present on a variety of different cell types and explains in part the broad host range of this serotype.⁷ Three coreceptors have been identified for AAV2 so far, α V β 5 integrin,⁸ human fibroblast growth factor receptor,⁹ and hepatocyte growth factor receptor.¹⁰ In addition, several receptors have been found for other serotypes, including 2,3 O-linked sialic acid as coreceptor for AAV4 (ref. 11), and 2,3 N-linked sialic acid and platelet-derived growth factor receptor- α as coreceptors for AAV5 (refs. 11-13). The 2,3 and 2,6 N-linked sialic acids are the coreceptors for AAV serotypes 1 and 6 (ref. 14) and the 37/67 kDa laminin receptor was shown to be the main receptor for AAV8 and plays a role in the cellular uptake of serotypes 2, 3, and 9 (ref. 15).

AAV2 and AAV5 particles enter cultured cells by clathrin-mediated endocytosis,¹⁶ and are found in HeLa cells in early endosomes immediately after entry. These cellular compartments traffic through the cytoplasm and rapidly approach a perinuclear location, where they mature into late endosomes. In contrast to AAV2, serotype 5 capsids, in addition to being found in the endosomes, can also be found in the trans-Golgi apparatus, indicating differences in endosomal trafficking between serotypes.¹⁷ Moreover, it has been shown that intracellular trafficking of AAV2 particles is different in a LN229 glioma cell line compared to HeLa cells, demonstrating that trafficking of AAV particles is dependent on the cell type studied.¹⁸ Experiments on lung epithelial cells showed that endosomal processing of AAV2 particles is impaired when cellular uptake happens on the apical surface,¹⁹ a mechanism that was not observed when using AAV5 particles.²⁰

In cell lines such as HeLa, 293 HEK, or HepG2, the endosomal compartments are acidified during intracellular translocation,^{21,22} a maturation step that exposes VP1/VP2 N-terminal sequences containing nuclear localization signals and a phospholipase A2 domain.²³⁻²⁵ These changes seem to be necessary for the endosomal escape of AAV particles.

Correspondence: Fabienne Rolling, Laboratoire de Thérapie Génique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U649, CHU-Hotel Dieu, Bât. J. Monnet, 30 Avenue J. Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail: fabienne.rolling@univ-nantes.fr

Studies on HeLa and 293 HEK cell lines and on airway epithelia revealed that having reached perinuclear localization, capsids from serotypes 2, 5, 7, and 8 are ubiquitinated and directed to the proteasome, the cellular protein degradation machinery.^{26–28} Indeed, blocking proteasomal degradation increases transduction efficiency of AAV2 and 5 vectors,^{21,29} which supports the hypothesis that capsid degradation happens before or during nuclear entry. Recently, epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase has been identified as a potential inhibitor of ubiquitinylation of AAV2 capsids, which in turn facilitates nuclear transport by limiting proteasome-mediated degradation of AAV vectors.³⁰

However, little is known about this crucial step during infection, the transfer of viral genome across the nuclear envelope. Some groups claim that the whole capsid enters the nucleus,^{31,32} whereas other groups state that capsid uncoating happens in the cytoplasm and only the viral DNA enters the nucleus.^{33,34} Interestingly, intranuclearly injected antibodies specifically targeting the viral capsid abolished transduction of HeLa and 293 HEK by AAV2, supporting the hypothesis that entire particles enter the nucleus prior to uncoating.²⁴ Because the mechanisms of nuclear entry and capsid degradation are still unclear, the question of whether all AAV particles are degraded or not following transduction of a cell has yet to be answered *in vivo*.

The purpose of this study was to evaluate, several years after a single vector administration, the status of AAV particles in the retina of dogs and primates that successfully underwent gene transfer experiments. Using transmission electron microscopy (EM), including direct observation and immunogold labeling, and western blot analysis, we performed screenings of retinas from one primate and four dogs, following subretinal injection of AAV serotypes 4, 5, and 2.

RESULTS

Detection of AAV-like particles by EM in the retina of dogs and nonhuman primates several years post-subretinal administration

The macaque designated P1 was subretinally injected in the right eye with the AAV2/4.hRPE65.TetOn.epo vector (1×10^{10} particles, **Table 1**), which displayed regulated EPO expression upon doxycycline induction over the duration of the experiment,³⁵ and was killed 2.5 years postvector administration. Semithin sections of both eyes were stained with toluidin blue (**Figure 1a**) and

ultrathin sections were screened for the presence of viral particles by transmission EM (**Figure 1b–f**).

Electron-dense particles were observed in the injected area of the right eye within the outer plexiform layer (OPL) of the retina (**Figure 1b–e**). The size (21 nm) and a typical hexagonal shape similar to viral particles supported their identification as AAV particles (**Figure 1e**, inset). The majority of AAV particles was found in closed compartments (**Figure 1c,d**). The presence of synaptic ribbon structures (arrow in **Figure 1c**) confirms that these compartments are synaptic invaginations of horizontal and bipolar cells into either the rod photoreceptor spherule or the cone photoreceptor pedicule (**Figure 1g**). Viral particles can be found within and outside of these invaginations, indicating that they localize both pre- and postsynaptically within photoreceptors and in horizontal and bipolar cells. AAV particles were not detected in any other retinal layer including the retinal pigment epithelium (RPE).

Screenings of ultrathin retinal slices from the contralateral noninjected eye did not reveal the presence of AAV particles in the OPL or in any other layer of the retina (**Figure 1f**).

To further elucidate the identity of the observed AAV particles, we performed immunogold labeling on ultrathin sections from the same epon blocks of P1. For this purpose, we used the monoclonal mouse anti-AAV4 capsid protein antibody (ADK4) that specifically reacts with intact AAV4 particles. ADK4 recognizes a conformational epitope of assembled capsids, not present in denatured capsid proteins and native but unassembled capsid proteins.³⁶ To verify the capacity of ADK4 to detect AAV4 particles using immunogold labeling, it was first tested on the injected vector suspension (**Figure 2a,b**).

On epon sections of P1, AAV4 immunogold-labeled particles were detected in the OPL, confirming the direct observation of the EM screening (**Figure 2c,d**). The relatively low number of marked particles in the immunogold labeling experiment compared to the EM screening is due to the processing technique of the retinal tissue, as glutaraldehyde fixation and epon embedding provides very good ultrastructural preservation and vector particle visualization but causes also a significantly reduced antigenicity of any given epitope.³⁷ No AAV4 particles were detected in the contralateral noninjected eye of P1 (data not shown).

Following these intriguing results, we wanted to know whether similar observations could be made for other AAV serotypes, especially the clinically relevant serotypes 5 and 2.

Table 1 Detection of AAV particles by electron microscopy and western blot

Animal	Vector	Amount of vector injected (vg)	Time post-subretinal injection (years)	Cell layers, where vector particles are found by EM	Detection of VP3 by western blot
P1	AAV2/4.TetOn.epo	1×10^{10}	2.5	OPL	nd
D1	AAV2/5.CMV.gfp	2×10^{11}	4	RPE OPL GC	nd
D2	AAV2/2.CMV.gfp	2.8×10^{10}	6	IPL OPL	nd
D3	AAV2/2.CMV.gfp	8×10^{10}	0.3	nd	+
D4	AAV2/5.CMV.gfp	2×10^{10}	2	nd	+

EM, electron microscopy; GC, ganglion cells; IPL, inner plexiform layer; nd, not done; OPL, outer plexiform layer; PR, photoreceptor; RPE, retinal pigment epithelium; vg, vector genome.

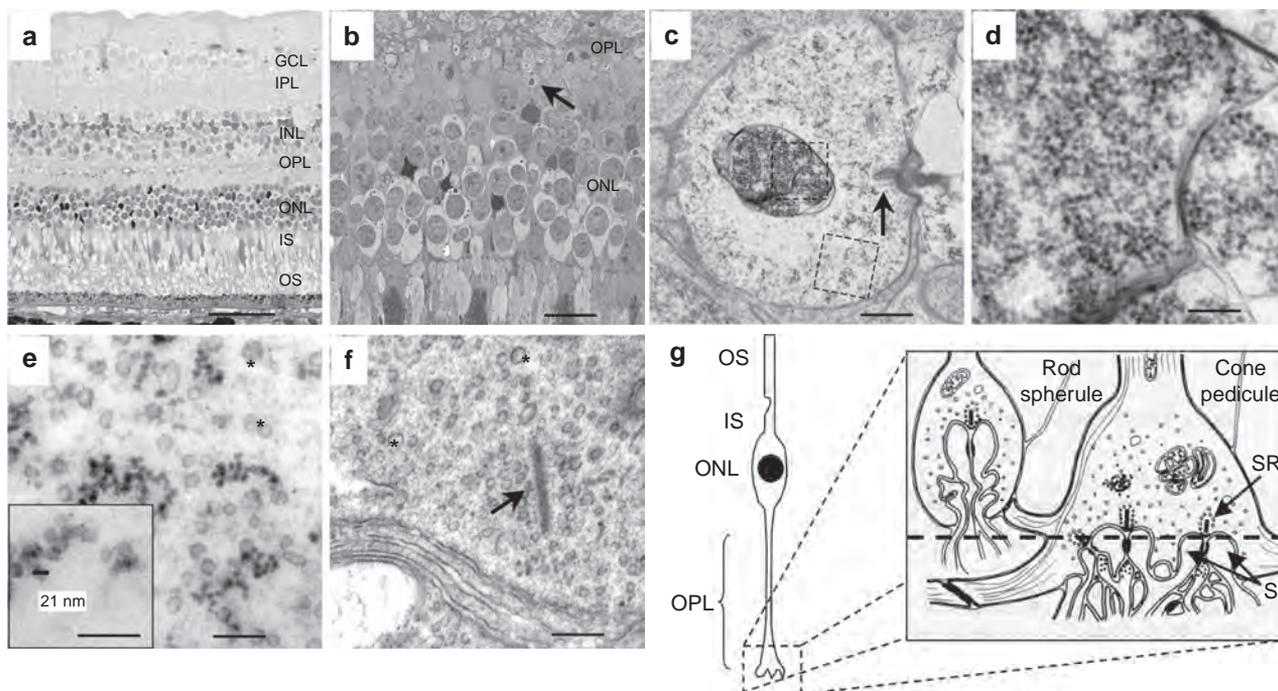


Figure 1 Detection of adeno-associated viral (AAV) particles in the treated retina of P1. **(a)** Semithin section of the right, injected retina. Bar = 200 μ m. **(b–e)** Ultrathin sections of the right, injected retina at different magnifications. **(b)** Portion of the retina, where viral particles were found (indicated by an arrow). Bar = 20 μ m. **(c)** Magnification of the area indicated in **b**. The arrow marks a synaptic ribbon structure. The squares indicate the location of the images in **d** and **e**. Bar = 1 μ m. **(d)** Vector particles are found inside of synaptic invaginations. Bar = 200 nm. **(e)** Vector particles are found outside of synaptic invaginations, within the photoreceptor. Asterisks mark synaptic vesicles with a medium diameter of 50 nm. Bar = 200 nm. The insert represents a magnification to identify the hexagonal structure and the size of the particles of 21 nm. Bar = 100 nm. **(f)** Ultrathin section of the left, noninjected retina. The arrow marks a synaptic ribbon structure. Asterisks mark synaptic vesicles with a medium diameter of 50 nm. Bar = 200 nm. **(g)** Schematic representation of the anatomic structures within rod spherule and cone pedicule. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer (photoreceptor nuclei); IS, inner segments (of photoreceptors); OS, outer segments (of photoreceptors); RPE, retinal pigment epithelium; SR, synaptic ribbon; SI, synaptic invagination.

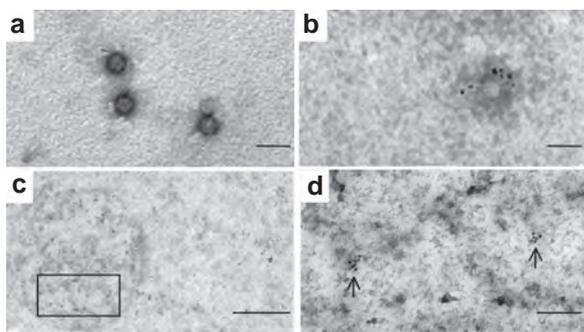


Figure 2 Identification of adeno-associated viral (AAV)4 particles in the treated retina of P1 by immunogold labeling. **(a)** AAV4 particles of the injected vector suspension observed by direct electron microscopy. **(b)** AAV4 particles of the vector suspension detected by immunogold labeling using mouse monoclonal anti-AAV4 antibody ADK4 and goat antimouse antibodies conjugated to 6 nm gold particles. Bar = 50 nm. **(c)** Epon section of P1 showing the OPL area. The square indicates the area highlighted in **d**. Bar = 500 nm. **(d)** Magnification of the area indicated in **c**. Vector particles are marked with the conjugated gold particles similar to **b**. Bar = 100 nm.

Two dogs, D1 and D2, which had been subretinally injected in the right eye with rAAV2/5.CMV.gfp and rAAV2/2.CMV.gfp, and which displayed stable GFP expression over time,³⁸ were killed 4 and 6 years postvector administration, respectively. The total amount of vector particles injected was 2×10^{11} and $2.8 \times$

10^{10} particles for AAV2/5 and AAV2/2, respectively (**Table 1**). Both eyes were processed and analyzed by direct EM observation similarly to the primate eyes. Ultrathin sections of the retinas revealed electron-dense particles in several layers of the treated retina of both animals (**Figures 3** and **4**). In D1, these particles, of the same size and shape as those observed in the macaque retina, were again found in the synaptic invaginations of horizontal and bipolar cells into rod spherules or cone pedicles (**Figure 3a–c**). In addition, AAV5 particles were found in the RPE (**Figure 3d–f**) and in ganglion cells (**Figure 3g–i**).

In D2, the majority of the particles were detected in the inner plexiform layer (**Figure 4a–c**) and a small amount of AAV2 particles was detected in the OPL (**Figure 4d–f**). No particles were found in the contralateral noninjected eyes of D1 and D2. For all animals, AAV particles were mainly found within the site of administration (bleb), but a few were also found outside of the injected area (data not shown).

Detection of the AAV VP3 capsid protein, by western blot analysis, in the retina of dogs and nonhuman primates several years post-subretinal administration

To verify the findings of the EM screening, additional retinas were analyzed by western blot using antibodies specific to the capsid proteins of AAV (VP1, VP2, and VP3). Two dogs, D3 and D4, which had been subretinally injected into the right eye with

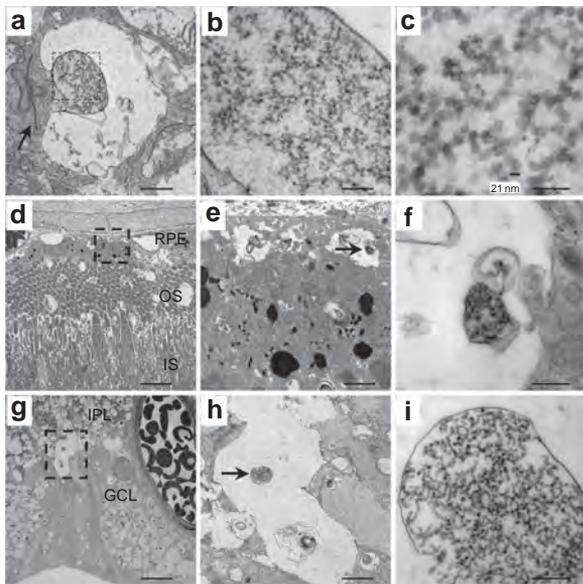


Figure 3 Detection of adeno-associated viral (AAV) particles in the treated retina of D1. **(a–c)** Ultrathin sections of the portion of the retina representing the outer nuclear layer at different magnifications. **(a)** Portion of the retina representing the outer plexiform layer. The arrow indicates a synaptic ribbon structure. The square marks the area of higher magnification in **b**. Bar = 1 μ m. **(b)** Vector particles are found inside of synaptic invaginations. Bar = 200 nm. **(c)** Magnification of **b** to identify the hexagonal structure and the size of the particles of 21 nm. Bar = 100 nm. **(d–f)** Ultrathin sections of the portion of the retina representing the RPE at different magnifications. **(d)** Portion of the retina where viral particles are found (indicated by a square). Bar = 20 μ m. **(e)** Magnification of the area indicated in **d**. Vector particles are found inside closed compartments (indicated by an arrow). Bar = 1 μ m. **(f)** Magnification of **e**. Bar = 200 nm. **(g–i)** Ultrathin sections of the portion of the retina representing the ganglion cells. **(g)** Portion of the retina where viral particles are found (indicated by a square). Bar = 20 μ m. **(h)** Magnification of the area indicated in **g**. Vector particles are found inside closed compartments. Bar = 2 μ m. **(i)** Magnification of **h**. Bar = 200 nm. RPE, retinal pigment epithelium; OS, outer segments (of photoreceptors); IS, inner segments (of photoreceptors); IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.

rAAV2/2.CMV.gfp and rAAV2/5.CMV.gfp, and which displayed stable GFP expression over time, were killed at either 3 months or 2 years, respectively, postvector administration. The total amount of vector injected was 8×10^{10} and 2×10^{10} particles for AAV2/2 and AAV2/5, respectively (**Table 1**).

Total protein was extracted from the left and the right retina, and the monoclonal antibody B1 was used to detect the AAV2 VP capsid proteins.³⁹ The detection limit for AAV2 capsids using B1 antibody was in the range of 1×10^7 to 5×10^7 (**Figure 5a**). The polyclonal antibody anti-AAV VP1 + VP2 + VP3 commercialized by Progen was used to detect AAV5 capsid proteins (Progen, Heidelberg, Germany). AAV5 capsids were detected ranging from $\sim 1 \times 10^6$ to 5×10^6 (**Figure 5b**). Due to the fact that the stoichiometric ratio of the capsid proteins to form one icosahedral AAV capsid is 1:1:10 for VP1:VP2:VP3, the band for the VP3 protein is always the strongest on a western blot (**Figure 5**, left lanes). As a result, the VP3 protein could be detected by western blot in the right injected retina of both animals, D3 and D4 (**Figure 5a**, lane R; and **Figure 5b**, lanes R1, R2). In addition, in dog D4, AAV5 capsid proteins were detected inside the injected area (**Figure 5b**,

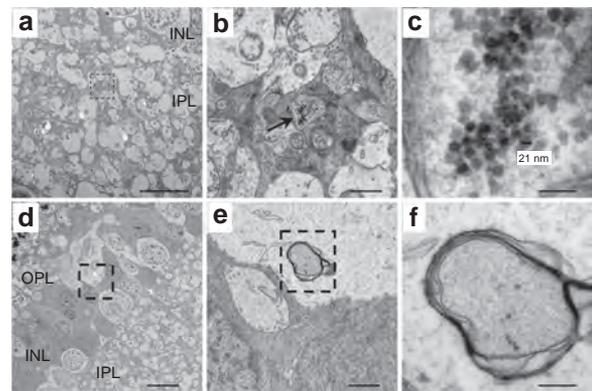


Figure 4 Detection of adeno-associated viral (AAV) particles in the treated retina of D2. **(a–c)** Ultrathin sections of the portion of the retina representing the INL. **(a)** Portion of the retina where viral particles are found (indicated by a square). Bar = 20 μ m. **(b)** Magnification of the area indicated in **a**. Vector particles are found inside of cellular structures (arrow). Bar = 1 μ m. **(c)** Magnification of **b** to identify the hexagonal structure and the size of the particles of 21 nm. Bar = 100 nm. **(d–f)** Ultrathin sections of the portion of the retina representing the OPL. **(d)** Portion of the retina where viral particles are found (indicated by a square). Bar = 20 μ m. **(e)** Magnification of the area indicated in **d**. Vector particles are found inside closed compartments (square). Bar = 1 μ m. **(f)** Magnification of **e**. Bar = 200 nm. INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; OPL, outer plexiform layer.

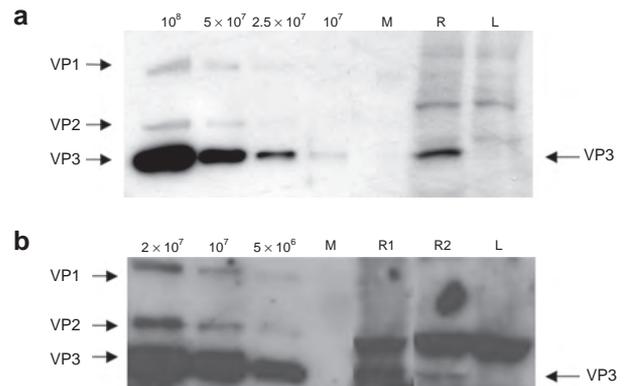


Figure 5 Detection of adeno-associated viral (AAV) VP3 capsid protein in the treated retina of D3 and D4. **(a)** Western blot analysis of 60 μ g of total protein extracted from the right, treated retina (R) and the left, untreated retina (L) of Dog D3, which had been injected with an AAV2/2 vector. The marker lane (M) separates the sample lanes from a sensitivity assay for the antibody B1 (left). For this assay, AAV2/2 particles at different concentrations were mixed with 60 μ g of total protein extracted from the retina of an untreated control animal. **(b)** Western blot analysis of 60 μ g of total protein extracted from the right, treated retina inside the injected area (R1), and outside of the injected area (R2), and from the left, nontreated retina (L) of Dog D4, which had been injected with an AAV2/5 vector. The marker lane (M) separates the sample lanes from a sensitivity assay for the antibody Progen (left). For this assay, AAV2/5 particles at different concentration were mixed with 60 μ g of total protein extracted from the retina of an untreated control animal.

lane R1) and, to a lesser extent, outside of the injected area (**Figure 5b**, lane R2). For both dogs, no VP3 protein was detected in the contralateral noninjected retina (**Figure 5a,b**, lane L).

These results confirm the presence of AAV particles in the subretinally injected eye several years postadministration of the vector. In accordance with what has been observed by EM,

the western blot analysis suggest that most of the AAV particles detected are located within the injected area (the bleb) with fewer particles being detected outside the targeted area.

DISCUSSION

In this study, a total of five large animals has been screened for the presence of AAV particles in the retina following several years of successful AAV-mediated retinal gene transfer. Using EM in one macaque and two dogs, AAV particles of three different serotypes (AAV4, -5, and -2, respectively) were found in retinal cells of the treated retina, mainly in neuronal synapses, up to 6 years post-subretinal injection. This has been further validated by immunogold labeling of the vector particles in the treated retina of P1 using a monoclonal antibody that specifically binds to intact AAV4 particles. These EM observations have also been confirmed by the detection of the AAV VP3 capsid protein in the rAAV2- or rAAV5-treated retinas of two dogs by using western blot analysis. These results demonstrate the persistence of intact AAV particles in the targeted retina several years after subretinal injection of the vector.

To our knowledge, this is the first report wherein intact AAV particles are shown to persist in cells *in vivo* several years post-vector administration. This is in striking contrast to the current hypothesis, which postulates that all capsid proteins are degraded by the proteasomal machinery. *In vitro* studies showed that having reached perinuclear localization, capsids from serotypes 2, 5, 7, and 8 are ubiquitinated and directed to the proteasome, the cellular protein degradation machinery.²⁶⁻²⁸

The presence of AAV particles in the treated retina is not likely due to unwanted AAV replication, as AAV vectors cannot replicate in animals in the absence of helper virus and virus rep/cap proteins that can propagate AAV2 ITRs. By using a replication center assay, we confirmed that the batches of rAAV used in this study were not contaminated with adenovirus or rep-positive AAV.⁴⁰

Another hypothesis is that the particles detected could be wild-type AAV particles following naturally acquired infection of the animals. However, the fact that these particles were systematically observed in the injected retina and not in the noninjected control retina is an important argument against a naturally acquired infection with wt AAV.

A very interesting finding was the presence of AAV vector particles inside and, to a lesser extent, outside of the injected area. In all studies published to date on the transfer of genes into the retina using known AAV serotypes, expression of the transgene was always limited to the injected area. One exception was the recent finding by our group that AAV serotype 8 allows the expression of transgenes outside of the injected area in the retina of rats and dogs.⁴¹

The results of the present study suggest that even though transgene expression following subretinal injection of AAV serotypes 2, 4, and 5 is limited to the injected area, some of the vector particles are transported outside of the injection zone.

For all treated retinas, vector particles were found in cells that do not display expression of the transgene. For rAAV2/4 that only transduces the RPE,⁴² vector particles were detected in the OPL (P1) (Figure 6a). For AAV2/5 (D1) and rAAV2/2 (D2) that display expression of the transgene in both the RPE and the photoreceptors,⁴³ viral particles were found in the RPE, in the OPL and ganglion cell layer

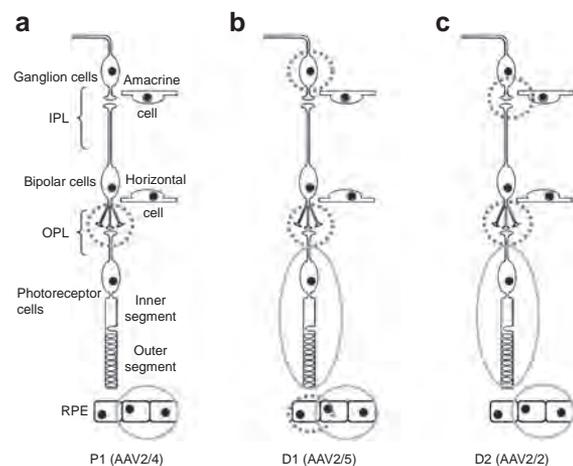


Figure 6 Schematic drawing of the retina and depiction of the localization of the adeno-associated viral (AAV) particles found by electron microscopy. **(a)** Localization of AAV particles in the retina of P1, after subretinal injection of a rAAV2/4 vector. **(b)** Localization of AAV particles in the retina of D1 after subretinal injection of an AAV2/5 vector. **(c)** Localization of AAV particles in the retina of D2 after subretinal injection of an AAV2/2 vector. The red spotted circles indicate the location, where particles are found. The green circles indicate the cells in which transgene expression can be observed. IPL, inner plexiform layer; OPL, outer plexiform layer; RPE, retinal pigment epithelium.

for D1 (Figure 6b) and in the inner plexiform layer and OPL for D2 (Figure 6c). These results suggest that expression of the transgene in a specific cell does not depend only on the ability of the vector to enter into this cell but may also be conditioned by the capacity of the vector to be processed by the endocytic pathway and to deliver the viral genome into the nucleus of the cell. The presence of AAV5 particles in ganglion cells and AAV2 particles in the inner plexiform layer, which are more distant from the injection site, is somewhat difficult to explain. One hypothesis would be a transsynaptic transport from photoreceptors to these cells.

It was previously observed that following intravitreal or subretinal injection of AAV2/2 vectors in dogs or primates, vector DNA was detected along the visual pathway in the brain.^{44,45} More recently, we demonstrated that following subretinal injection of an AAV2/8 vector, we observed the expression of GFP in all the cells of the neuroretina and in distal neurons of the lateral geniculate nucleus contralateral to the injected eye.⁴¹ All together, these previous observations suggested that AAV particles can travel by axonal and transsynaptic transport from the retina to the brain via the visual pathway.

In this study, the hypothesis of transsynaptic transport of vector particles in the retina is strongly supported by the presence of AAV particles presynaptically within the rod spherule and/or cone pedicle and postsynaptically in the connecting invaginations of horizontal and bipolar cells (OPL).

The persistence of virions several years post-subretinal injection may have important consequences not only for ongoing clinical trials targeting the retina, but also for other organs, as it has been generally accepted, until now, that unprocessed viral particles would be rapidly degraded. Very recently, it has been suggested that persistence of intact vector particles and expression of transgenes may occur simultaneously in the same cell as vector DNA can uncoat independently of capsid degradation.⁴⁶ Regarding gene

transfer to the retina, following subretinal injection, the vector is administered into a confined compartment of the eye, into the subretinal space. This unique characteristic of retinal gene transfer may have facilitated the detection of vector particles within the targeted organ. For evident anatomical reason, detection of AAV particles following gene transfer in the muscle, in the brain, or in the liver might be more challenging as the vector is rapidly diluted and disseminated within the entire organ and/or body.

In a recent clinical trial of hepatic AAV factor IX gene transfer into hemophilia B patients, transgene expression started to decline 4–6 weeks after vector administration.⁴⁷ Apparently, this was caused by rejection of transduced hepatocytes by AAV capsid-specific memory CD8⁺ T cells reactivated by AAV vectors.⁴⁸ The finding that AAV virions can persist intact *in vivo* raises the possibility that it could happen in immune competent cells, which in turn could potentially favor the induction and the maintenance of an immune response against the AAV capsid.

Regarding preclinical studies in the canine or primate retina, no detectable immune responses against AAV2/2 or AAV2/4 capsids leading to loss of transgene expression have been observed in large animal models,^{35,45,49} which could be in part explained by the immunoprivileged status of the eye. However, considering that the cytotoxic immune response against AAV capsids in the liver of humans was not observed in the preclinical studies in dogs and nonhuman primates,^{48,50} one cannot exclude such immune response following retinal gene transfer in humans. The three clinical trials that have started recently in the United Kingdom and the United States for gene replacement therapy as treatment of retinal dystrophy caused by defects in the *RPE65* gene^{4–6} should evaluate this important issue. To date, at 12 months postvector administration, no immune response against viral capsid protein was observed in any treated patient.

In this study, we demonstrate for the first time that intact AAV particles can persist within transduced and nontransduced cells of the retina several years post-subretinal administration of the vector in primates and dogs that underwent efficient gene transfer. As the medical field deals with clearance of recombinant vectors, this discovery opens the concept of *in vivo* intracellular clearance as a potentially critical factor to consider for the design of gene therapy clinical trials.

MATERIALS AND METHODS

Production of AAV vector. Generation of AAV2/4.TetOn.epo, AAV2/2.CMV.gfp, and AAV2/5.CMV.gfp has been described earlier.^{35,38} All vectors were produced as previously described⁵¹ in the Vector Core at the University Hospital of Nantes (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>), and the titer was determined by dot blot and expressed as vector genomes/ml.⁴⁰ All vector batches used were characterized using a modified replication center assay.⁴⁰ No infectious adenovirus or rep-positive AAV were detected.

Subretinal delivery. The beagle dogs (D1–D4) used in this study were purchased from the Centre d'Élevage du Domaine des Souches, Mezilles, France. Primate P1 was purchased from BioPrim, Baziège, France. All animals were cared for in accordance to the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. Injection protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes.

Surgical procedure was conducted by a transvitreal approach in the right eye as described previously by Weber *et al.*⁴²

Electron microscopy. Animals were euthanized by an intravenous overdose of anesthesia, eyes were removed, and immediately fixed in 0.1 M cacodylate-buffered Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde). Forty-eight hours later, the anterior chamber, lens, and vitreous were removed and the remaining retina again fixed in Karnovsky's solution for 48 hours. The retina was then postfixed in 1% osmium tetroxide (2 hours) at pH 7.3, dehydrated in graded ethanols, and embedded in the EMbed-812 epoxy resin (all reagents from Science Services, Munich/Germany, automated LYNX-Tissue processor Leica, Bensheim/Germany). After 48 hours heat polymerization at 60 °C, semithin (0.8 μm) tissue sections were cut, stained with toluidine blue and basic fuchsin and analyzed under a light microscope.

After selection of the appropriate area on the semithin section, the epon block was trimmed for ultrathin sectioning. Ultrathin (80 nm) sections were cut with a diamond knife on a Reichert Ultracut-S ultramicrotome and stained with aqueous 2% uranyl acetate and lead citrate solutions for 10 minutes each. The sections were examined in a LEO912AB electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at 80 k in a zero-loss mode.

Immunogold labeling. The immunogold labeling was carried out using the automated LYNX-Tissue processor (Leica, Bensheim, Germany) in a modified negative staining approach on AAV2/4 vector stock solution or on epon sections.

A formvar-coated 400 mesh nickel grid was placed on a suspension drop containing the AAV2/4 vector for 10 minutes at room temperature. Subsequently, the grid was incubated for 1 hour with the monoclonal mouse ADK4 antibody (anti-AAV4 particles antibody, kindly provided by Jürgen Kleinschmidt, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) diluted 1:2 in 1% phosphate buffered saline (PBS)/bovine serum albumin (BSA) with continuous agitation in the IGL processor. After washing, the grid was incubated for 30 minutes in 1% PBS/BSA buffer containing a 1:20 dilution of goat antimouse IgG gold conjugates (6 nm gold particles; Aurion, Wageningen, the Netherlands). An additional fixation step in 2% glutaraldehyde in PBS followed, and after washing in ddH₂O the negative staining with 1% phosphotungstic acid in water for 1 minute at room temperature was performed.

The postembedding immunogold labeling was done on sections of the epon-embedded material as described above with preceding epon section etching and antigen retrieval. The pretreatment of the ultrathin sections on formvar-coated nickel grids consisted of etching with 2% sodium metaperiodate for 4 minutes at room temperature, washing, and the antigen retrieval with 10 mmol/l sodium citrate buffer at pH 6.0 for 1 hour at room temperature. After extensive washing, the grids were quenched with 1% PBS/BSA and incubated with the monoclonal mouse ADK4 antibody diluted 1:2 or 1:10 in 1% PBS/BSA. The secondary goat antimouse IgG gold conjugate (6 and 10 nm gold particles; Aurion) was applied in a 1:20 dilution for 1 hour at room temperature. Nonspecific binding was blocked by washing in PBS, followed by an additional postfixation in 2% glutaraldehyde, and the sections were finally stained with 1% aqueous uranyl acetate for 1 minute.

All immunogold-labeled sections were examined in a LEO912AB electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at 80 k in a zero-loss mode.

Western blot analysis. Two dogs, D3 and D4, were euthanized by an intravenous overdose of anesthesia and the eyes were removed. The eyes were cut through the pars plana, and the anterior segment and the lens were removed. The eye cup was cut peripherally in four sections and flattened. In dog D3, the injected part of the retina was separated from the rest of the retina. Tissues were stored at –80 °C until further processing.

Retinas were homogenized by using a Polytron Homogenizer (Kinematica AG, Littau/Lucerne, Switzerland) twice for 15 seconds at 30,000 rpm. After incubation on ice for 1 hour with repeated aspirations

through a syringe every 15 minutes, the sample was centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatant was removed into a new vial, and the protein concentration was measured using a BC assay kit (Uptima, Interchim Montluçon, France).

Migration of total protein extraction was performed on 6% Tris-Glycine PAGE gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) and proteins were transferred to a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham, Paris, France). The membrane was stained with Ponceau Red (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Falavier, France) to verify the correct transfer of the proteins.

Nonspecific antigen binding was blocked by overnight incubation of the membrane at 4°C in blocking buffer (0.2% Tween/PBS, 5% milk powder) followed by a second overnight incubation at 4°C in blocking buffer containing the following primary antibodies at the indicated dilution: B1 (monoclonal mouse anti-AAV VP proteins) at 1:20 (kindly provided by Jürgen Kleinschmidt, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany); Progen (polyclonal rabbit anti-AAV VP1+VP2+VP3) at 1/500 (Progen, Heidelberg, Germany). After being washed three times in 0.2% Tween/PBS for 5 minutes at room temperature, the membrane was incubated for 1 hour at room temperature with Peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin G antibody at 1:2000 (Dakocytomation #P0447, Trappes Cedex, France) or Peroxidase-conjugated donkey antirabbit immunoglobulin G antibody (H+L) at 1:2000 (Jackson 711-035-152, Charles River Laboratories, l'Arbresle Cedex, France). The membrane was again washed three times in 0.2% Tween/PBS, followed by enhanced chemiluminescence detection using the ECL western blotting substrate (Thermoscientific Rockford, IL).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Matthew Ellinwood (Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, Iowa, USA) for critical reading and editing. We thank Jürgen Kleinschmidt (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) for providing the B1 and the ADK4 antibodies. We thank Beate Voll and Heiko Sigmund for outstanding technical assistance regarding electron microscopy. We also thank the Vector Core (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>) at the University of Nantes, the Association Française contre les Myopathies, the INSERM, and the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire.

REFERENCES

- Acland, GM, Aguirre, GD, Ray, J, Zhang, Q, Aleman, TS, Cideciyan, AV *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* **28**: 92–95.
- Narfstrom, K, Katz, ML, Ford, M, Redmond, TM, Rakoczy, E and Bragadottir, R (2003). *In vivo* gene therapy in young and adult RPE65^{-/-} dogs produces long-term visual improvement. *J Hered* **94**: 31–37.
- Le Meur, G, Stieger, K, Smith, AJ, Weber, M, Deschamps, JY, Nivard, D *et al.* (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther* **14**: 292–303.
- Bainbridge, JW, Smith, AJ, Barker, SS, Robbie, S, Henderson, R, Balaggan, K *et al.* (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**: 2231–2239.
- Maguire, AM, Simonelli, F, Pierce, EA, Pugh, EN Jr, Mingozzi, F, Bennicelli, J *et al.* (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**: 2240–2248.
- Hauswirth, W, Aleman, TS, Kaushal, S, Cideciyan, AV, Schwartz, SB, Wang, L *et al.* (2008). Phase I trial of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results. *Hum Gene Ther* **7**: 7.
- Summerford, C and Samulski, RJ (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**: 1438–1445.
- Summerford, C, Bartlett, JS and Samulski, RJ (1999). $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**: 78–82.
- Qing, K, Mah, C, Hansen, J, Zhou, S, Dwarki, V and Srivastava, A (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* **5**: 71–77.
- Kashiwakura, Y, Tamayose, K, Iwabuchi, K, Hirai, Y, Shimada, T, Matsumoto, K *et al.* (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* **79**: 609–614.
- Kaludov, N, Brown, KE, Walters, RW, Zabner, J and Chiorini, JA (2001). Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**: 6884–6893.
- Walters, RW, Yi, SM, Keshavjee, S, Brown, KE, Welsh, MJ, Chiorini, JA *et al.* (2001). Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem* **276**: 20610–20616.
- Di Pasquale, G, Davidson, BL, Stein, CS, Martins, I, Scudiero, D, Monks, A *et al.* (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**: 1306–1312.
- Wu, Z, Miller, E, Agbandje-McKenna, M and Samulski, RJ (2006). $\alpha 2,3$ and $\alpha 2,6$ N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol* **80**: 9093–9103.
- Akache, B, Grimm, D, Pandey, K, Yant, SR, Xu, H and Kay, MA (2006). The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol* **80**: 9831–9836.
- Bartlett, JS, Wilcher, R and Samulski, RJ (2000). Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **74**: 2777–2785.
- Bantel-Schaal, U, Hub, B and Kartenbeck, J (2002). Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol* **76**: 2340–2349.
- Pajusola, K, Gruchala, M, Joch, H, Luscher, TF, Yla-Herttuala, S and Bueler, H (2002). Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells. *J Virol* **76**: 11530–11540.
- Duan, D, Yue, Y, Yan, Z, McCray, PB Jr and Engelhardt, JF (1998). Polarity influences the efficiency of recombinant adeno-associated virus infection in differentiated airway epithelia. *Hum Gene Ther* **9**: 2761–2776.
- Zabner, J, Seiler, M, Walters, R, Kotin, RM, Fulgeras, W, Davidson, BL *et al.* (2000). Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* **74**: 3852–3858.
- Douar, AM, Poulard, K, Stockholm, D and Danos, O (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* **75**: 1824–1833.
- Bleker, S, Sonntag, F and Kleinschmidt, JA (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *J Virol* **79**: 2528–2540.
- Girod, A, Wobus, CE, Zadori, Z, Ried, M, Leike, K, Tijssen, P *et al.* (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**: 973–978.
- Sonntag, F, Bleker, S, Leuchs, B, Fischer, R and Kleinschmidt, JA (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* **80**: 11040–11054.
- Grieger, JC, Snowdy, S and Samulski, RJ (2006). Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly. *J Virol* **80**: 5199–5210.
- Yan, Z, Zak, R, Luxton, GW, Ritchie, TC, Bantel-Schaal, U and Engelhardt, JF (2002). Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* **76**: 2043–2053.
- Ding, W, Zhang, L, Yan, Z and Engelhardt, JF (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* **12**: 873–880.
- Denby, L, Nicklin, SA and Baker, AH (2005). Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* **12**: 1534–1538.
- Yan, Z, Zak, R, Zhang, Y, Ding, W, Godwin, S, Munson, K *et al.* (2004). Distinct classes of proteasome-modulating agents cooperatively augment recombinant adeno-associated virus type 2 and type 5-mediated transduction from the apical surfaces of human airway epithelia. *J Virol* **78**: 2863–2874.
- Zhong, L, Zhao, W, Wu, J, Li, B, Zolotukhin, S, Govindasamy, L *et al.* (2007). A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Mol Ther* **15**: 1323–1330.
- Sanlioglu, S, Benson, PK, Yang, J, Atkinson, EM, Reynolds, T and Engelhardt, JF (2000). Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* **74**: 9184–9196.
- Seisenberger, G, Ried, MU, Endress, T, Buning, H, Hallek, M and Brauchle, C (2001). Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science* **294**: 1929–1932.
- Xiao, W, Warrington, KH Jr, Hearing, P, Hughes, J and Muzyczka, N (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol* **76**: 11505–11517.
- Lux, K, Goerlitz, N, Schlemminger, S, Perabo, L, Goldnau, D, Endell, J *et al.* (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol* **79**: 11776–11787.
- Stieger, K, Le Meur, G, Lasne, F, Weber, M, Deschamps, JY, Nivard, D *et al.* (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.
- Kuck, D, Kern, A and Kleinschmidt, JA (2007). Development of AAV serotype-specific ELISAs using novel monoclonal antibodies. *J Virol Methods* **140**: 17–24.
- Brorson, SH (2002). pH-dependent effect of heat-induced antigen retrieval of epoxy section for electron microscopy. *Micron* **33**: 481–482.
- Le Meur, G, Weber, M, Pereon, Y, Mendes-Madeira, A, Nivard, D, Deschamps, JY *et al.* (2005). Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* **123**: 500–506.
- Wistuba, A, Weger, S, Kern, A and Kleinschmidt, JA (1995). Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol* **69**: 5311–5319.
- Salveti, A, Oreve, S, Chadeuf, G, Favre, D, Chérel, Y, Champion-Arnaud, P *et al.* (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**: 695–706.

41. Stieger, K, Colle, MA, Dubreil, L, Mendes-Madeira, A, Weber, M, Le Meur, G *et al.* (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* **16**: 916–923.
42. Weber, M, Rabinowitz, J, Provost, N, Conrath, H, Folliot, S, Briot, D *et al.* (2003). Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther* **7**: 774–781.
43. Auricchio, A, Kobinger, G, Anand, V, Hildinger, M, O'Connor, E, Maguire, AM *et al.* (2001). Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet* **10**: 3075–3081.
44. Provost, N, Le Meur, G, Weber, M, Mendes-Madeira, A, Podevin, G, Cherel, Y *et al.* (2005). Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* **11**: 275–283.
45. Jacobson, SG, Acland, GM, Aguirre, GD, Aleman, TS, Schwartz, SB, Cideciyan, AV *et al.* (2006). Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection. *Mol Ther* **13**: 1074–1084.
46. Murphy, SL, Bhagwat, A, Edmonson, S, Zhou, S and High, KA (2008). High-throughput Screening and Biophysical Interrogation of Hepatotropic AAV. *Mol Ther* **30**: 30.
47. Manno, CS, Pierce, GF, Arruda, VR, Glader, B, Ragni, M, Rasko, JJ *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342–347.
48. Mingozzi, F, Maus, MV, Hui, DJ, Sabatino, DE, Murphy, SL, Rasko, JE *et al.* (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**: 419–422.
49. Leberer, C, Auricchio, A, Maguire, AM, Rivera, VM, Tang, W, Grant, RL *et al.* (2005). Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **16**: 178–186.
50. Mingozzi, F, Hasbrouck, NC, Basner-Tschkarajan, E, Edmonson, SA, Hui, DJ, Sabatino, DE *et al.* (2007). Modulation of tolerance to the transgene product in a non-human primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* **3**: 3.
51. Rabinowitz, JE, Rolling, F, Li, C, Conrath, H, Xiao, W, Xiao, X *et al.* (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* **76**: 791–801.

Annexe 2

***In vivo* Gene Regulation Using Tetracycline-Regulatable Systems.**

Knut Stieger^{1,2}, Brahim Belbellaa¹, Caroline Le Guiner¹, Philippe Moullier¹ and Fabienne Rolling¹. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, vol. 61 n°7-8, p527-41.

¹INSERM U649, CHU-Hotel Dieu, Nantes, France.

²Department of Ophthalmology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany.



In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems[☆]

Knut Stieger^{a,b}, Brahim Belbellaa^a, Caroline Le Guiner^a, Philippe Moullier^a, Fabienne Rolling^{a,*}

^a INSERM UMR U649, CHU-Hotel Dieu, Nantes, France

^b Department of Ophthalmology, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2008

Accepted 15 December 2008

Available online 23 April 2009

Keywords:

Gene regulation

Tetracycline

Doxycycline

Retina

Brain

Rat

Mouse

Nonhuman primate

ABSTRACT

Numerous preclinical studies have demonstrated the efficacy of viral gene delivery vectors, and recent clinical trials have shown promising results. However, the tight control of transgene expression is likely to be required for therapeutic applications and in some instances, for safety reasons. For this purpose, several ligand-dependent transcription regulatory systems have been developed. Among these, the tetracycline-regulatable system is by far the most frequently used and the most advanced towards gene therapy trials. This review will focus on this system and will describe the most recent progress in the regulation of transgene expression in various organs, including the muscle, the retina and the brain. Since the development of an immune response to the transactivator was observed following gene transfer in the muscle of nonhuman primate, focus will be therefore, given on the immune response to transgene products of the tetracycline inducible promoter.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1.	Introduction	528
2.	Molecular mechanism involved in tetracycline-regulatable systems	528
2.1.	TetOff (tTA, TetR-VP16)	528
2.2.	TetOn (rtTA, rTetR-VP16)	528
2.3.	KRAB TetOn (tTS, TetR-KRAB)	529
2.4.	Combined TetOn (rtTA and tTS)	530
2.5.	Autoregulatory loop TetOn–TetOff	530
3.	Pharmacology of Doxycycline	530
4.	Regulation of transgene expression	530
4.1.	Regulation of transgene expression in the muscle	530
4.2.	Regulation of transgene expression in the retina	531
4.3.	Regulation of transgene expression in the brain	534
4.3.1.	Reporter genes and proof of principle	534
4.3.2.	Alzheimer's disease	534
4.3.3.	Huntington's disease	534
4.3.4.	Parkinson's disease	535
4.3.5.	Brain cancer	535
4.3.6.	Chronic pain	535
4.3.7.	Stem cells and siRNA regulation	536
4.4.	Regulation of transgene expression in other organs	536
4.4.1.	Liver	536
4.4.2.	Hematopoietic cells	537
4.4.3.	Cancer	537
4.4.4.	Cartilage and bone tissue	537

[☆] This review is part of the *Advanced Drug Delivery Reviews* theme issue on "Gene Regulation for Effective Gene Therapy".

* Corresponding author. Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM U649, CHU-Hotel Dieu, Bât. J. Monnet, 30 Avenue J. Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. Tel.: +33 2 40 08 74 90; fax: +33 2 40 08 74 91.

E-mail address: fabienne.rolling@univ-nantes.fr (F. Rolling).

5. Immune response to the TetOn transactivator is observed following gene transfer in the muscle, but not following gene transfer in the retina of nonhuman primates	537
6. Conclusion	538
References	538

1. Introduction

The clinical efficacy and safety as well as the application range of gene therapy will be broadened by developing systems capable of finely modulating the expression of therapeutic genes. A regulatable system that can turn “on” and “off” therapeutic gene expression will not only be crucial for maintaining appropriate levels of a gene product within the therapeutic range, thus preventing toxicity, but also allow the turning “off” of therapeutic gene expression to avoid harmful side effects. The development of ligand-dependent transcription regulatory systems is thus of great importance.

To be used in human gene therapy, a pharmacologically regulated system should fulfil several criteria as follows: (1) The ligand should activate (ON-switch) rather than silence transcription (OFF-switch). Off-systems suffer from 2 drawbacks: a prolonged exposure to the drug is required to silence the system and the induction kinetics is mainly determined by the rate of drug clearance; (2) the inducer drug should be orally bioavailable and penetrate the target tissue; (3) the system should not interfere with endogenous metabolic pathways and the inducer compound should have a drug metabolism profile compatible with prolonged therapeutic uses; (4) transcription should be fully and rapidly reversible to enable prompt changing of the dosing regimen; (5) the system should be inactive in the absence of the inducer drug but strongly stimulated by the drug administration; (6) a precise correlation must exist between drug dosage and target gene expression level; and (7) the transcriptional activator should exhibit a low potential of eliciting an immune response in humans.

Four drug-dependent regulatable systems, which meet most of the criteria listed above, were developed for the *in vivo* control of transgene expression: the tetracycline (tet) [1,2] and rapamycin [3] regulatable systems, the mammalian steroid receptor (mifepristone and tamoxifen) [4,5], and the insect steroid receptor (ecdysteroid)-based systems [6,7]. The molecular mechanism underlying the regulatory effect and the pharmacologic characteristics of the inducer drug are distinct in these different regulatory systems, but transgene regulation has been documented *in vitro* and in rodent models (for review [8,9]). Only the tetracycline and the rapamycin regulatable systems have been tested in large animal models so far [10–18].

This review will focus on the tetracycline-regulatable systems. Besides, the molecular mechanisms of different variants of the system and the pharmacologic characteristics of the inducer drug, the regulation of transgene expression in various organs including muscle, retina, and brain, will be explored in this review. Only the preclinical studies that are potentially most relevant clinically for future gene therapy clinical trials, will be discussed in detail.

2. Molecular mechanism involved in tetracycline-regulatable systems

Tet-regulatable systems are based on the *E. coli* Tn10 Tet resistance operon, which consists of the Tet repressor protein (TetR) and the Tet operator DNA sequence (TetO DNA) [19]. In the absence of Tet or its derivative doxycycline (Dox), the TetR protein gets attached to the TetO DNA sequence, while in the presence of the drug, TetR changes its conformation to detaching from the DNA [20].

Five different Tet-responsive regulatory systems have been developed, based on this bacterial operon system, that are normally cloned in two different expression cassettes (Fig. 1A). The first two systems

contain the TetR protein fused to the transactivator VP16 of Herpes simplex virus (HSV) [1,2]. If transgene expression is allowed only in the absence of Dox, the system is called TetOff (Fig. 1B), whereas if transgene expression is allowed only in the presence of Dox, the system is called TetOn (Fig. 1C). The third system contains the TetR protein fused to a transinhibitor protein, the Krüppel-associated box (KRAB) of Zinc finger proteins [21]. The TetR-KRAB system is designed to allow transgene expression only in the presence of Dox (TetOn, Fig. 1D). In an attempt to minimize background levels of transgene expression, two alternative systems have been developed. The first one being a combination of the rTetR-VP16 and the TetR-KRAB systems (combined TetOn, Fig. 1E), and a second system based on an autoregulatory loop, in which the transactivator is not constitutively expressed but under control of the inducible promoter (autoregulatory loop, Fig. 1F), thus making it possible to have only one expression cassette with an internal ribosomal entry site (IRES) or a bidirectional promoter.

In this section, each system is going to be described on the molecular basis for the better understanding of the different *in vivo* applications.

2.1. TetOff (*tTA*, *TetR-VP16*)

In this system, the chimeric protein, which is the product of the DNA binding domain of the TetR and the transactivator domain of VP16, is called *tTA* (for Tet-controlled transcriptional activator). Seven repeats of the TetO DNA sequence, also referred to as TRE (for Tet-responsive elements), are fused upstream of a minimal CMV promoter ($P_{\min}CMV$), forming the compound promoter P_{CMV-1} [1]. In the absence of Dox, *tTA* binds to the TREs thus activating P_{CMV-1} , which results in the expression of the adjacent gene (Fig. 1B). If Dox is present, *tTA* changes its conformation, detaches from the TREs and gene expression is silenced. Furth and colleagues have shown for the first time the functionality of the system *in vivo* in bigenic mice harbouring the *tTA* gene and a reporter gene [22]. To minimize possible interactions of the VP16 transactivator with other cellular promoters and to avoid the onset of immune reactions, this protein was reduced to three minimal repeats of 12 amino acids [23].

The TetOff system is useful only if gene expression is to be maintained to a switch-on state for a long time. To turn the system off, continued administration of Dox would be required and the activation of transgene expression depends mainly on the clearance kinetics of Dox. These reasons limit the usefulness of the system for potential human applications due to which the use of this system was restricted to early experiments *in vivo*.

2.2. TetOn (*rtTA*, *rTetR-VP16*)

Four mutations in the TetR domain of the transactivator *tTA* were shown to reverse the behaviour of the protein in interacting with the TRE in response to the presence or absence of Dox [2]. Rather than attaching to the TRE in the absence of Dox, this mutant reverse Tet repressor protein (*rTetR*) stays soluble and binds the TREs in the presence of Dox. When *rTetR* is fused to the VP16 domain, the resulting transactivator protein is called *rtTA* and the system changes to a TetOn system: only the presence of the inducer drug allows expression of a transgene (Fig. 1C).

Activation of transgene expression was found to be more rapid compared to the TetOff system [2,24]. However, to induce transgene expression using the TetOn system, high concentrations of Dox were

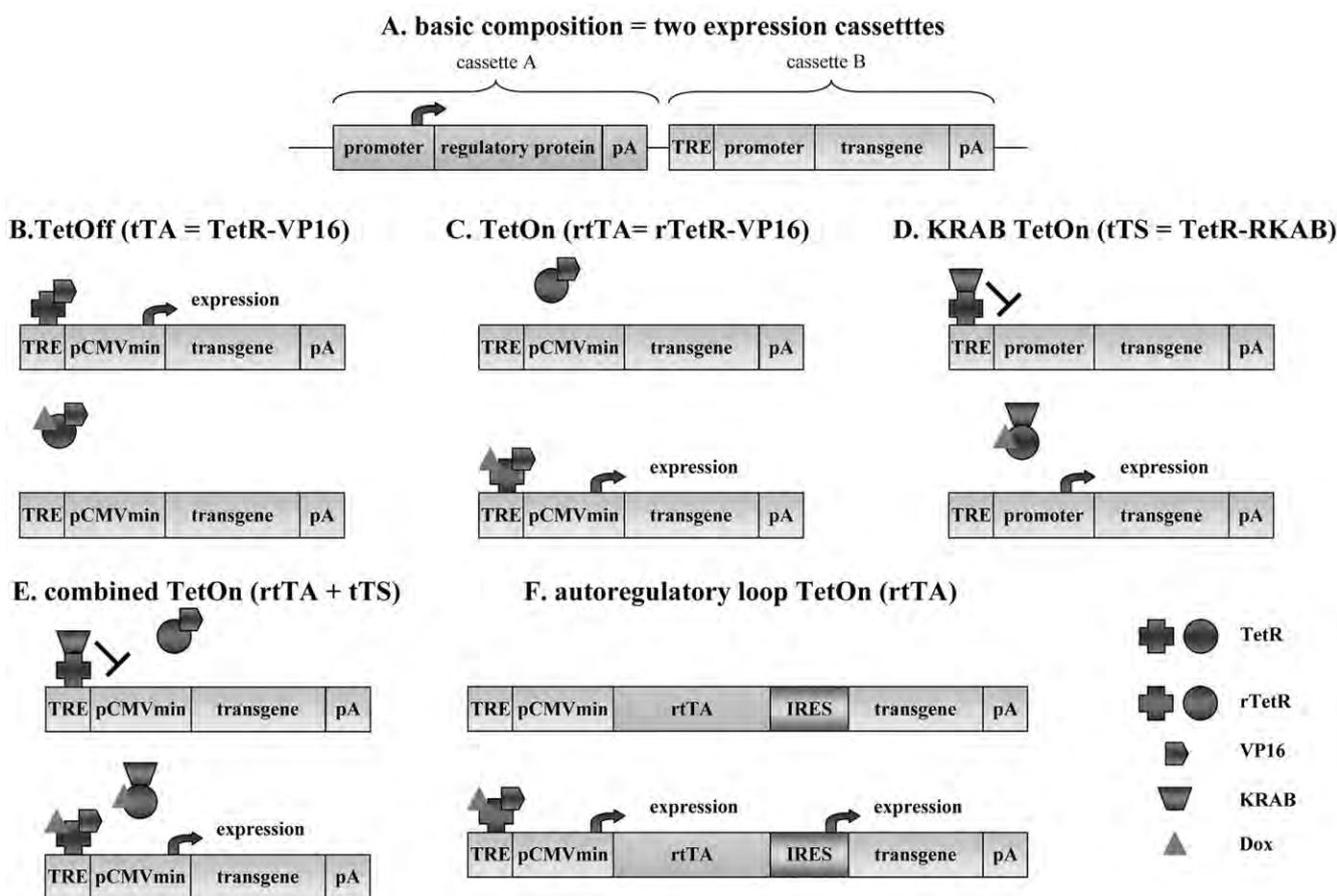


Fig. 1. Schematic representations of the five different Tet-regulatable systems. (A) In general, Tet-regulatable systems are composed of two distinct expression cassettes, one containing the regulatory protein (tTA, rtTA, tTS) under the control of a ubiquitous cell type specific promoter (cassette A) and the second cassette containing the Tetracycline Responsive Element (TRE) fused to a promoter, regulating the expression of the reporter or therapeutic transgene (cassette B). (B) The chimeric protein tTA is composed of the TetR fused to the viral transactivator VP16. In the absence of Dox, the tTA protein binds to the TRE within the compound promoter PCMV_{min} to allow the expression of the transgene. In the presence of Dox, the tTA changes its conformation, gets detached from the TRE and no transgene expression is observed. (C) The rtTA transactivator is also a chimeric protein composed of the TetR and the VP16 domains. However, due to the presence of four mutations in the TetR (now called rTetR) domain, this protein fixes the TRE in the presence of Dox, thus allowing transgene expression. In the absence of Dox, rtTA gets detached from the TRE and no transgene expression is observed. (D) The chimeric protein tTS is composed of the TetR fused to the KRAB box of Zink finger proteins. In the absence of Dox, tTS binds to the TRE and inhibits transgene expression driven by a normal promoter (i.e. CMV). In the presence of Dox, tTS gets detached from the TRE, thus allowing transgene expression. (E) The combined TetOn system contains both the rtTA and the tTS protein, simultaneously expressed from cassette A. In the absence of Dox, the tTS protein binds to the minimal compound promoter and inhibits even the low background expression, while the rtTA protein stays detached from the TRE. In the presence of Dox, rtTA binds to the TRE and activates expression of the transgene, while tTS stays detached. (F) In the autoregulatory loop system, both rtTA (or tTA) and the transgene of interest are driven by the compound minimal promoter separated by an internal ribosomal entry site (IRES). In the absence of Dox, no transgene is expressed, while in the presence of Dox, both transgenes, transactivator and gene of interest, are expressed. Onset of expression takes longer, because initially, sufficient amounts of rtTA need to be produced to completely activate the system.

required, raising the question of whether these concentrations were possible to achieve in tissues such as in the brain [25]. Urlinger and colleagues studied the performance of several mutated rtTA proteins, which were developed by random mutagenesis and codon optimisation [26]. They found new rtTA transactivators, in particular rtTA^{S-2}-M2 and rtTA^{S-2}, which showed an improved sensitivity to the inducer drug and a reduced background activity in the absence of Dox [26,27].

This system confers with most of the requirements to be used in human patients (see Introduction) and has therefore been used in numerous *in vivo* studies in rodent models and has already advanced to preclinical studies in nonhuman primates [10,12,13,17,18,28].

2.3. KRAB TetOn (tTS, TetR-KRAB)

Due to the fact that a potential immune response against rtTA is primarily triggered against the viral part of the fusion protein, attempts were made to replace this part of rtTA by a less immunogenic protein. Deuschle and colleagues developed a system, in which the

original TetR protein was fused to the transrepressing domain KRAB of the human Zink finger protein Kox1, forming a transinhibitor called TetR-KRAB, or tTS [21,29,30]. In other studies, the KRAB domain has been retrieved from the rodent Zink finger protein Kid-1 and the transrepressor is called tTS^{Kid} [31,32]. Zink finger proteins are regulatory proteins and their KRAB domain is known to inhibit all RNA polymerases II or III within a range of 3 kb of its DNA attachment site [21,33]. The second part of the TetR-KRAB system, the compound promoter (PTetO-CMVlg) used for the expression of the transgene, consists of TRE fused upstream to a normal CMV promoter that does not need activation. In the absence of Dox, TetR-KRAB gets attached to the TRE and inhibits the activity of the CMV promoter, while in the presence of Dox, TetR-KRAB gets detached from the TRE, thus allowing transgene expression (Fig. 1D).

The mechanism by which KRAB inhibits expression of genes is not entirely known. Three mechanisms seem to be involved: local change in chromatin structure (triggering heterochromatin), local histone deacetylation, and the indirect influence of the arrangement of the

basal transcription machinery [34–40]. It has been proposed that only integrated promoters can be inhibited by the TetR-KRAB system [41]. However, different studies demonstrated efficient regulation of transgene expression *in vivo* using non-integrating adenoviral vectors [42,43].

The system has been used in transformed cell lines [44] *in vitro* and *in vivo* in different organs in mice using lentiviral vectors, which integrate their viral DNA [41,45].

2.4. Combined TetOn (rtTA and tTS)

To minimize background expression of the TetOn system, KRAB-mediated inhibition was incorporated in addition to the rtTA system [46]. For this purpose, the tTS gene is cloned into a bicistronic expression cassette downstream of the transactivator, separated by the use of an internal ribosomal entry site (IRES). In the absence of Dox, the rtTA would stay detached from the TRE while the tTS would fix and inhibit background expression of the transgene. In the presence of Dox, the two chimeric proteins would change their conformation and reverse their activity, thus allowing transgene expression (Fig. 1E).

This combined system has been used in several *in vivo* studies where low background activities were described, while the maximum levels of transgene expression in the presence of Dox were similar to those in pure TetOn systems. However, one group observed progressive loss of transgene expression in CHO cells transduced with lentiviral vectors containing this combined system with long-term culture and repeated inductions [47].

The question of whether the expression of three foreign proteins in one cell will have negative effects on the immunological situation *in vivo* has to be addressed. In addition, due to size restrictions, this system cannot be incorporated in a single vector system using all available viral vectors (i.e. AAV vectors), which may cause problems for observing certain protocols. This system has been used *in vivo* in several organs, including muscle, retina and brain, which will be reviewed in Section 4.

2.5. Autoregulatory loop TetOn–TetOff

A second strategy to minimize background expression is to place both transgenes, the transactivator and the gene of interest, under the compound Tet-inducible promoter P_{CMV-1} (Fig. 1F) [48]. Using such a system, no rtTA is expressed in the absence of the inducer drug, which is in contrast to the original TetOn system, where rtTA expression is placed under a constitutive promoter. Therefore, the inducible P_{CMV-1} promoter cannot interact with constitutively expressed rtTA in a Dox-independent, non-specific manner. Dox-mediated induction of expression of the gene of interest may take longer, as the rtTA has to be expressed first, but the immunogenicity and potential toxicity of the transactivator is restricted to the time of induction. Evidently, the autoregulatory loop can also be used as a TetOff mechanism, placing the tTA rather than the rtTA transactivator under control of the minimal CMV promoter [49,50].

Autoregulatory loop systems have been used as naked plasmids or cloned into lentiviral vectors *in vitro* [51,52] and in several studies *in vivo*, which will be discussed in Section 4.

3. Pharmacology of Doxycycline

Dox, an analogue of Tet, is a well-documented antibiotic drug because it has been used in the clinics for more than 30 years. It is available for oral or intravenous application. The bioavailability of Dox after oral administration compared to intravenous administration is almost 100% and the serum half-life has been calculated to be 14–22h. The tissue penetration is excellent and includes the brain. Concentrations are the highest in liver, kidney and digestive tract, as it is eliminated primarily via urine and faeces (for review [53]).

Dox is currently considered as one treatment option for infectious diseases such as Lyme disease [54], malaria [55] or *multi-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) infections [56]. Interestingly, Dox has been approved by the FDA in 2006 for usage in the treatment of rosacea (acne) by sub-antimicrobial doses, so-called “anti-inflammatory-dose Dox” (40 mg/day per adult person, corresponding to less than 1 mg/kg body weight) [57–59].

Side effects of prolonged administration of Dox include renal toxicity and dose-dependent photosensitivity. Dox may accumulate in the bones and in young patients in the teeth, leading to teeth decolouration and decreased bone growth rate [57].

However, the main concern while using an antibiotic-driven regulatory switch remains to be the possibility of raising resistance to the antibiotic itself, even though Dox at doses of 40 mg/day (“anti-inflammatory-dose Dox”) or less are not considered to lead to the development of antibiotic-resistant organisms [57].

This problem of potentially raising antibiotic resistance to Dox may also be overcome by the use of 4-epidoxycycline, a hepatic metabolite of Dox lacking antibiotic activity in mice [60]. In conditional knockout mice, 4-epidoxycycline was as effective as Dox in switching transgene expression “on” or “off”.

4. Regulation of transgene expression *in vivo*

In this section, we aim to review the use of the Tet-regulatable system to regulate transgene expression *in vivo* (Table 1). Regarding each organ, focus will be given on the most advanced strategies in terms of their potential clinical application.

Some strategies have already reached the level of nonhuman primates, which is the last stage before the clinical use in human patients (Table 1, highlighted in gray). These strategies have been developed to regulate transgene expression employing the TetOn system after AAV-mediated gene transfer either in the muscle (chapter 4.1) [10,13], in the retina (chapter 4.2) [17,18], or, following High Capacity (HC) adenoviral vector-mediated gene transfer, in the liver (chapter 4.4.1) [16]. In contrast, regulated transgene expression in the brain was studied predominantly in rat, often in rat models with CNS diseases. The focus here will be given on three different strategies: (i) the TetOn system following lentiviral vector-mediated gene transfer [61], (ii) the autoregulatory loop following AAV-mediated gene transfer [62–64], and (iii) the combined TetOn system following HC-Ad vector-mediated gene transfer [65,66]. In other organs or in cancer models, the published studies were limited to early experiments performed in mice, and therefore will not be mentioned in detail in the following section.

4.1. Regulation of transgene expression in the muscle

The skeletal muscle is one of the largest organ systems in the mammalian organism and easily accessible. Therefore, attempts at expressing therapeutic proteins from skeletal muscle were one of the earliest applications for regulated gene therapy. Due to the facile quantification of erythropoietin (EPO) in the serum and the obvious biological effect in increasing the hematocrit levels in the induced animals, this hormone has been used in many published works as a reporter gene [13,27,49,68–75]. Besides EPO, other reporter genes have been used to study regulated transgene expression from the muscle, i.e. secretable alkaline phosphatase (SEAP) [12,74,76], luciferase (LU) [67,77] or β -galactosidase [78]. In addition, several studies employed potentially therapeutic proteins, for example IL-10 [79,80].

Proof of principle experiments on regulated transgene expression using the TetOff system in the skeletal [81] or the heart muscle [67] of mice following direct plasmid injection precluded muscle directed gene transfer of a TetOff regulatory system encapsidated in AAV vectors [68]. Soon afterwards, the TetOn system has also been used to

control EPO expression in the skeletal muscle following cell based or AAV-mediated gene transfer [69,71].

Bohl and colleagues constructed an AAV vector, in which the original rtTA transactivator was placed under the control of a strong CMV promoter, and the murine EPO expression cassette was constructed in a way that both cassettes were laid directly opposite to each other [70]. Within one week of Dox administration via the drinking water, EPO concentrations in the serum raised by 10-fold and decreased to baseline levels within 14 days of Dox withdrawal. Following induction of EPO expression, hematocrit levels increased accordingly, demonstrating the biological activity of transgenic EPO. No immune response was observed in mice either to the rtTA transactivator, or to the EPO protein. Similar results leading to tight and long-term control of EPO expression were observed in a murine model of β -thalassemia [72].

These encouraging results in mice led to the transfer of this system into the nonhuman primate muscle. Favre and colleagues injected AAV2 vectors carrying the TetOn (rtTA transactivator) into the skeletal muscle of 8 primates [28]. Initially, all primates showed tight regulation of transgene expression with rapid induction and de-induction kinetics [10]. Following intravenous Dox administration, serum EPO levels increased to a maximum within 3–4 days, which was followed by an increase of the reticulocyte counts in the serum, demonstrating once again the biological activity of the transgenic EPO. The animals were regularly bled to avoid high hematocrit discomfort following the inductions.

However, the inducibility of EPO expression following intravenous injection of Dox vanished and was completely lost following two to five Dox pulses [10]. This was due to the appearance of a humoral and cellular response against the transactivator protein, resulting in destruction of rtTA-expressing cells within the skeletal muscle (for further details, see chapter 5 of this review).

To obtain a more stringent regulation of transgene expression, optimised versions of the transactivator, such as rtTA-S2, rtTA-M2, and rtTA-M2nls, were cloned in different orientations into expression cassettes that were incorporated into AAV2 vectors and transferred into the muscle of mice and subsequently of nonhuman primates [13]. In addition, the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE) was introduced following the EPO cDNA. Based on the evaluation of different designs of the expression cassette in mice, it was observed that when both promoters driving the expression of the transgene and the rtTA-M2 were positioned apart from each other, but oriented in the same direction (forward), inducibility was optimal and background expression remained minimal. This cassette (forward) was then studied in the muscle of nonhuman primates using the AAV1 and AAV2 serotypes. It was shown that using the AAV1 serotype for the transduction of primate skeletal muscle, almost 10 times higher serum EPO concentration could be observed compared to animals injected with serotype AAV2. In addition, the inducibility of the system seemed to be more effective in nonhuman primates than in mice, since a 50–200-fold increase of serum EPO could be observed with almost no baseline activity, while in mice the difference was around 20-fold. However, these values have to be studied with caution, as baseline expression of EPO could be quite undetectable in primates due to the large volume of blood in the circulatory system that would dilute the serum concentration of EPO [13].

The TetOn system was also used to regulate transgene expression following gene transfer by adenoviral vectors of angiogenic factor p27^{Kip1} in mice [82] or SEAP in primates [12]. EPO expression was also studied under the control of the TetOn system following naked DNA transfection in mice [27,78]. Importantly, in the study performed by Latta-Mahieu and colleagues in primates, a strong cellular and humoral immune response to the transactivator led to the loss of transgene expression, probably by the destruction of transgene expressing cells, which is in agreement with the results obtained in the study performed by Favre et al. [10] (for further details, see chapter 5 of this review).

Interleukin 10 (IL-10) is a strong anti-inflammatory cytokine that may offer a potential treatment option for rheumatoid arthritis (RA). Construction and intramuscular injection of two AAV vectors containing the IL-10 gene under the control of a TetOn regulatory system resulted in profound expression of IL-10 from the transduced muscle in a mouse model of chronic inflammatory arthritis over the duration of 8 weeks [80]. A similar strategy, proposed by the same group, used a plasmid transfection strategy, in which the IL-10 expression was controlled by a combined TetOn system (rtTA-M2 and tTS) for the duration of 3 months [79].

The combined TetOn system was also employed in several studies to regulate EPO expression in the muscle, either following AAV-mediated gene transfer [73], adenoviral vector-mediated gene transfer [76,77] or using plasmid transfection [74,78]. One study examined the controlled expression of different domains of the antiangiogenic factor plasminogen (K1-5, K1-3HSA) following plasmid gene transfer [83]. All studies that were performed in mice demonstrated successful regulation of transgene expression. In addition, Lamartina and colleagues studied the regulated expression of SEAP in the skeletal muscle of primates following direct plasmid injection. Even though the control of EPO expression in the mouse muscle could be demonstrated for up to 1 year, the study performed in the primate muscle lasted only for 14 days, which was not sufficient for long-term analysis of Tet-mediated regulation [74].

The autoregulatory loop, constructed as a TetOff system, was also used to study the regulated expression of EPO from skeletal muscle in mice [49]. Encapsulated myoblasts that were transfected with plasmids containing the autoregulatory loop TetOff system and EPO as reporter gene were implanted and EPO expression was controlled over a period of 40 weeks (duration of the experiment).

The optimisation of the TetOff expression cassette was reported by Agha-Mohammadi et al. [84]. In their study, the number of Tet operator elements that are fused to the compound minimal promoter was increased to 8 and the promoter sequence shortened. These new components of the Tet-regulatable systems were incorporated into an AAV vector, and expression of mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor (mGM-GSF) was controlled over a period of 4 weeks following intramuscular injection.

The most recent experiment on transgene regulation in the skeletal muscle was performed by Lena and colleagues, who studied the capacity of the combined TetOn (rtTA-M2 and tTS-kid) system to regulate EPO expression in mice following HC-Ad-mediated gene transfer [75]. They observed the development of a cellular immune response leading to loss of transgene regulation within 8 weeks after the gene transfer. This observation is reminiscent of what has been observed in primates [10,12]. However, the use of lower doses of adenoviral vector and the employment of a muscle-specific promoter was sufficient to avoid immune reactions in these mice and led to sustained regulation of transgene expression for 30 weeks [75].

In conclusion, stringent regulation of transgene expression in the muscle is possible using Tet-regulatable systems. However, the appearance of a strong immune response to the transactivators, regardless of original or optimised version, in nonhuman primates makes it difficult to further advance with this system [85]. This issue will be discussed in Section 5 of this review.

4.2. Regulation of transgene expression in the retina

The expression of several neurotrophic factors, such as ciliary neurotrophic factor (CNTF) or brain derived neurotrophic factor (BDNF), in the retina has shown to delay the onset of retinal degeneration in a variety of animal models of *Retinitis pigmentosa*. However, a long-term exposure of retinal cells to CNTF decreases the electroretinogram (ERG) responses due to the downregulation of several transcription factors in the photoreceptors [86]. Therefore, a regulated expression of neurotrophic proteins in the retina would

Table 1Regulation of transgene expression by tetracycline dependent systems *in vivo* (in gray: studies involving nonhuman primates).

Organ	Tetracyclin system	Transgene	Vector	Animal model	Duration of regulation (days)	Anti-transcription factor immune response		References
						Humoral	Cellular	
Muscle	TetOff	LU	Plasmid	Rat	6	nd	nd	[67]
	TetOff	LU, lacZ	Plasmid	Mouse	?	nd	nd	[81]
	TetOff	EPO, lacZ	AAV	Mouse	126	no	no	[68]
	TetOff	mGM-CSF	AAV	Mouse	56	nd	nd	[84]
	TetOn	EPO	Myoblasts	Mouse	161	nd	nd	[69]
	TetOn	EPO	Fibroblasts	Mouse	154	nd	nd	[71]
	TetOn	EPO	AAV	Mouse	203	nd	nd	[70]
	TetOn	p27	Ad	Mouse	28	nd	nd	[82]
	TetOn	EPO	AAV	Mouse	252	nd	nd	[72]
	TetOn	EPO	AAV	Primate	90–390	Yes	Yes	[10]
	TetOn	SEAP	Plasmid, Ad	Primate	40	Yes	Yes	[12]
	TetOn	EPO	Plasmid	Mouse	300	nd	nd	[27]
	TetOn	LU	Ad	Mouse	4	nd	nd	[77]
	TetOn	IL-10	AAV	Mouse	56	nd	nd	[80]
	TetOn	EPO	AAV	Mouse Primate	91 315	nd	nd	[113]
	TetOn, combined TetOn	lacZ	Plasmid	Rat	3–4	nd	nd	[78]
	Combined TetOn	IL-10	Plasmid	Mouse	90	nd	nd	[79]
	Combined TetOn	GFP, YFP, CNTF	Lentivirus	Rat	21	nd	nd	[104]
	Combined TetOn	SEAP	HC Ad	Mouse	220	nd	nd	[76]
	Combined TetOn	K1-5, K1-3HSA	Plasmid	Mouse	130	nd	nd	[83]
Combined TetOn	EPO SEAP	Plasmid	Mouse Primate	320 14	nd nd	nd nd	[74]	
Combined TetOn	EPO	HC Ad	Mouse	63–210	nd	Yes	[75]	
Autoregulatory loop	EPO	Myoblasts	Mouse	301	nd	nd	[49]	
Retina	TetOff	GFP	AAV	Rat	170	nd	nd	[90]
	TetOn	IL-10	AAV	Rat	49	nd	nd	[91]
	TetOn	EPO	AAV	Primate	270–840	no	no	[17]
	TetOn	EPO	AAV	Primate	900–1500	no	no	[18]
	Combined TetOn	GFP	AAV	Rat	63	nd	nd	[89]
Brain	TetOn/TetOff	GFP	Ad	Rat	91	nd	nd	[92]
	TetOff	TH	Ad	Rat	119	nd	nd	[93]
	TetOff	GFP	Lentivirus	Rat	42	nd	nd	[95]
	TetOff	lacZ	Ad	Rat	3	nd	nd	[94]
	TetOff	GFP	Ad	Rat	4–6	nd	nd	[98]
	TetOff	NGF, GFP	Fibroblasts	Rat	90	nd	nd	[101]
	TetOff	YFP, GFP, CNTF	Lentivirus	Rat	21	nd	nd	[104]
	TetOff	GFP	AAV	Rat	28	nd	nd	[97]
	TetOff	Pro-opiomelanocortin	Plasmid	Rat	14	nd	nd	[112]
	TetOff	TH	Cell line	Rat	84	nd	nd	[108]
	TetOff	lacZ	HSV-1	Mouse	2	nd	nd	[96]
	TetOff	DsRed	Lentivirus	Rat	14	nd	no	[100]
	TetOff	NGF	Lentivirus	Rat	14	nd	nd	[102]
	TetOn	LU	Ad	Rat	8	nd	nd	[77]
	TetOn	lacZ	Lentivirus	Rat	10	nd	nd	[99]
	TetOn	GDNF	Lentivirus	Rat	28–98	nd	nd	[61]
	TetOn	LU, TH	Lentivirus	Rat	10	nd	nd	[107]
	TetOn	BDNF, GFP	Retrovirus	Rat	84	nd	nd	[103]
	TetOn	GFP	Stem cells	Mouse	84	nd	nd	[114]
	TetOn	siRNA	AAV	Rat	35–42	nd	nd	[115]
	TetR-KRAB	siRNA	Lentivirus	Rat	56	nd	nd	[45]
	Combined TetOn	lacZ	HC Ad	Rat	35	nd	nd	[66]
	Combined TetOn	Pro-opiomelanocortin	Plasmid	Rat	14	nd	nd	[113]
	Autoregulatory loop	GFP	AAV	Rat	42	nd	nd	[48]
	Autoregulatory loop	GFP	AAV	Rat	28	nd	no	[50]
	Autoregulatory loop	GFP	AAV	Rat	30	nd	nd	[62]
	Autoregulatory loop	GDNF	AAV	Rat	56	nd	nd	[63]

Table 1 (continued)

Organ	Tetracyclin system	Transgene	Vector	Animal model	Duration of regulation (days)	Anti-transcription factor immune response		References	
						Humoral	Cellular		
Other organs	Liver	TetOff	lacZ, PLA2	Ad	Mouse	4–14	nd	nd	[121]
		TetOff	FIX	Lentivirus	Mouse	240	nd	nd	[118]
		TetOn	IFN α	HC Ad	Mouse	90	nd	nd	[116]
		TetOn	FIX	Ad	Mouse	60	nd	nd	[119]
		TetOn	IFN α	HC Ad	Mouse Rat Primate	66 57 150	nd	nd	[16]
		TetOn	GFP, LU, IFN γ	Ad	Mouse	4–14	nd	nd	[117]
		Combined TetOn	SEAP	Ad	Mouse	40	nd	nd	[120]
	Hemato-poietic system	TetOff	GFP, LU	Lentivirus	Mouse	140	nd	nd	[122]
		TetR-KRAB	siRNA	Lentivirus	Mouse	?	nd	nd	[45]
		Combined TetOn	GFP, FasI-GFP	Ad	Mouse	2	nd	nd	[127]
	Cancer	TetOff	GFP/Bax	Ad	Mouse	38	nd	nd	[126]
		TetOn	shRNA PI-3 kinase	PC-3 cell line	Mouse	56	nd	nd	[128]
		TetOn	HSV1-tk	MCF-7 cell line	Mouse	30	nd	nd	[123]
		TetOn	shRNA KILLER/DR5	HCT 116 cell line	Mouse	36	nd	nd	[129]
		TetOn	HSV1-tk	Retrovirus	Mouse	30	nd	nd	[125]
		TetOn	siRNA	Hela cell line	Mouse	51	nd	nd	[130]
		TetOn	HSV1-tk	AAV	Mouse	33	nd	nd	[124]
		TetR-KRAB, rTetR-KRAB	GDNF, GFP	Lentivirus	Rat	56	nd	nd	[45]
		Combined TetOn	SEAP	Lentivirus	Mouse	287	nd	nd	[47]
		Cartilage bone	TetOff	BMP2	Mesenchymal stem cells	Mouse	120	nd	nd
	TetOff		BMP2	Mesenchymal stem cells	Mouse	60	nd	nd	[133]
TetOn	lacZ		Chondrocytes	Rabbit	21	nd	nd	[131]	

avoid the onset of negative side effects while conserving the neuroprotective activity.

A similar strategy is currently being developed for neovascular disorders, the treatment of which consists currently in the injection of anti-VEGF molecules repeatedly into the vitreous to inhibit VEGF-mediated neovascularisation in age-related macula degeneration or diabetic retinopathy. The long-term blockage of VEGF activity by expressing such anti-VEGF molecules in the retina may be deleterious, as VEGF holds also some neuroprotective activities for neurons [87], and is responsible for normal development of vasculature [88]. Therefore, the regulation of transgene expression would be an important step towards a clinical application.

The first ever to evaluate Tet-regulatable control of transgene expression in the retina were McGee Sanftner et al. [89] by using a dual vector system: two AAV2/2 vectors containing either the combined TetOn (rtTA-M2 and tTS-Kid) cassette or the enhanced GFP gene under the control of the inducible minimal CMV promoter. A mix of both vectors was injected subretinally into rats, thus targeting photoreceptors and retinal pigment epithelium (RPE). The results demonstrated a successful induction and de-induction of GFP expression within 2 weeks of Dox administration or withdrawal respectively. No apparent side effects were observed. However, GFP expression was relatively low when compared to CMV driven expression, which was due to the ratio of both vectors injected (GFP containing vector and combined TetOn containing vector at 1:8) as well as the necessity of both vectors to transduce the same cell. Oral administration of Dox at very low levels (2 μ M) allowed for the onset of GFP expression, which increased with the increasing dose of Dox administered.

Folliot and colleagues used a single AAV vector carrying a TetOff system to control transgene expression in the retina [90]. A recombinant AAV2/2 vector carrying the destabilised *d2GFP* gene under the control of the TetOff system was injected intravitreally into

rats to warrant transduction of retinal ganglion cells. Regulation of *d2GFP* expression was very tight, with 95% of retinal GFP signal being gone within 48 h following oral administration of Dox via the drinking water. Upon Dox withdrawal, re-expression of *d2GFP* was slower, returning to full signal within 21 days, although it was readily detectable at 48 h.

The TetOn system was used to regulate interleukin 10 (IL-10) expression after intravitreal administration of rAAV2/2 into the rat eye [91]. IL-10 mRNA could be detected by RT-PCR in Dox-induced retinas two weeks after drug administration, while control non-induced retinas or mock-injected retinas remained undetected by RT-PCR. Upon induction of experimental autoimmune uveitis, animals that had been injected with AAV2/2.TetOn.vIL-10 and induced by Dox showed partial protection of the photoreceptors from degeneration due to the presence of transgenic IL-10, while non-induced animals or mock-injected animals developed severe uveitis with near complete loss of photoreceptors.

Our group developed a regulatory system based on the TetOn technique (rtTA-M2) that controls the expression of EPO in the eye of nonhuman primates [17,18]. The use of EPO as reporter protein allows easy and objective quantification of transgene expression in the anterior chamber fluid, which represents an advantage over the subjective evaluation of GFP expression.

Three different vectors, AAV2/5.CMV.TetOn.epo, AAV2/4.CMV.TetOn.epo and AAV2/4.pRPE65.TetOn.epo, were injected into a total of seven primates. Induction of EPO expression was performed initially by a 3-day Dox pulse given intravenously (10 mg/kg/day). After 2–4 days post-Dox administration, EPO concentrations reached a peak and declined to background levels within 10–14 days of withdrawal of the inducer drug. Maximum EPO concentrations in the a.c.f. were 1000 mU/ml, 100 mU/ml and 10 mU/ml for animals injected with AAV2/5.CMV.TetOn.epo, AAV2/4.CMV.TetOn.epo, and AAV2/4.pRPE65.TetOn.epo vectors respectively. This shows a range of

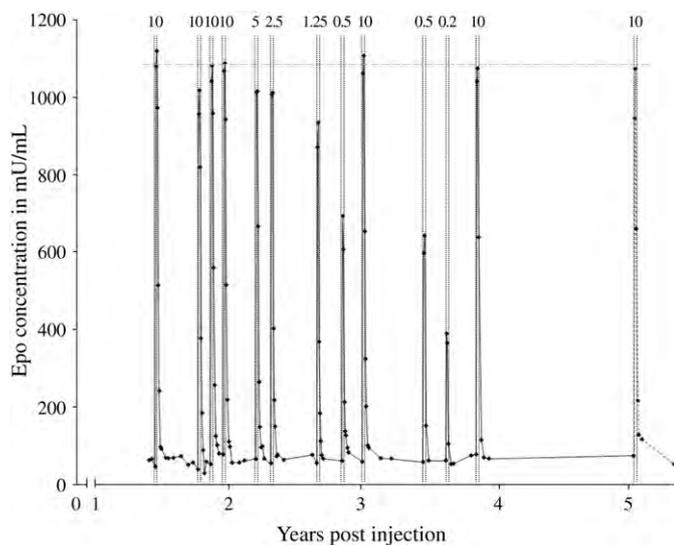


Fig. 2. Administration of Dox allows dose-dependent expression of EPO in the retina over 5 years after subretinal delivery of AAV2/5.CAG.TetOn.epo in macaque. Intravenous administration of Dox was performed by a 3-day Dox pulse (Dox-ratiopharm SF, Ratiopharm) and oral administration consisted of the daily uptake (3 days) of Dox hidden in dry fruits. Numbers above the peaks indicate the dose of Dox administered in mg/kg. Continuous graphs indicate intravenous administration of Dox and dotted graphs indicate oral administration of Dox. The horizontal dashed grey line indicates average peak EPO levels of the first 4 inductions by 10 mg/kg.

two orders of magnitude of possible concentrations for any given therapeutic protein, depending on the serotype and the amount of vector injected, and the promoter driving the expression of the rtTA-M2 protein. Regulated transgene expression is still being observed, to date that is for more than 5 years following administration of the AAV TetOn vector (Fig. 2). No immune response was observed either to transgene products, rtTA and EPO, or to the AAV vectors used.

Since the possibility of oral administration of Dox is a key to considering advancing to clinical trials, we also evaluated the influence of oral administration on the capacity to control transgene expression [18]. In this study, we not only demonstrated the equally efficient and tight control of induction and de-induction of EPO expression following oral administration of Dox, but we were also able to show that the system is capable of continuously inducing transgene expression for a time period of 6 months, without eliciting any negative side effects.

Therefore, following these extensive preclinical experiments in the nonhuman primate model, we consider this regulatory system as a useful tool in the development of neurotrophic or antiangiogenic gene therapy strategies in the retina.

4.3. Regulation of transgene expression in the brain

The expression of therapeutic genes in the brain following viral vector-mediated gene transfer is a powerful option for the potential treatment of various neurological disorders, including Parkinson's disease, Huntington's disease (HD), Alzheimer's disease and brain cancer. Recent advances to identify key obstacles for successful gene therapy applications in the brain, i.e. the mode of delivery and potential immune responses to vector or transgene, raise the hope for clinical trials to be realized in the near future. However, the need for regulated transgene expression remains to be an issue in the treatment of brain disorders.

Over the last decade, a variety of strategies for the regulated expression of transgenes in the brain have been developed employing different versions of the Tet system, different reporter genes and different viral vectors. The model organism for brain directed gene transfer using such regulatory systems is until now predominantly the rat.

4.3.1. Reporter genes and proof of principle

Proof of principle of *in vivo* Tet regulated expression in the brain was performed using AAV vectors for the transfer of GFP under the control of an autoregulatory loop or the TetOn system, respectively [48,50]. Adenoviral vectors were used for the transfer of GFP, LU and tyrosine hydroxylase (TH), comparing the TetOn (rtTA) and TetOff (tTA) systems side by side [92], or using the TetOn (rtTA) system [77,93] or TetOff system alone [94]. In addition, the possibility to use lentiviral vectors for the transfer was demonstrated using the TetOff system to control GFP expression [95]. More recently, even the HSV-1 vector system has been used for the transfer of a regulatory system into the brain, in which the reporter gene *lacZ* was driven under the control of the TetOff system [96]. Jiang and colleagues studied the effect of the orientation of the two expression cassettes in a TetOff system within the same AAV vector following intracerebral gene transfer [97]. They observed best control of transgene expression and minimal basal leakiness with a construction, in which both promoters driving the tTA and the GFP expression were positioned at both ends of the vector in opposite directions.

In order to target specific cell populations in the brain following adenoviral vector-mediated gene transfer, the transactivator gene was placed under the control of cell specific promoters, such as synapsin I or glial fibrillary acidic protein (GFAP) for targeting neurons or glial cells, respectively [98].

Following the development of the next generation transactivator rtTA-M2, the new TetOn system was used to regulate β -galactosidase expression following lentiviral vector-mediated gene transfer [99]. Using RT-PCR and immunostaining, the authors were able to demonstrate a tight regulation of β -gal expression in transduced areas of the brain.

Very recently, a regulated transgene expression strategy was developed, in which the expression of the tTA transactivator in a TetOff system was placed under the control of a second enhancement system based on the Gal4-NF- κ B p65 transcriptional activation system, in order to potentiate the expression of the tTA protein [100]. The authors reported high levels of transactivator production and an increased expression of red fluorescent protein (DsRed) in the rat brain.

4.3.2. Alzheimer's disease

Blesch and colleagues were among the first ever who demonstrated the regulated expression of neurotrophic factors in a brain disease model using the TetOff system to control the expression of nerve growth factor (NGF) or GFP in a rat model of Alzheimer's disease [101]. The transfer of the regulated expression cassette was performed using primary fibroblasts transduced by a retrovirus, and regulated expression was observed for 3 months. This initial study was followed by a modified experiment, in which the transfer of the regulated expression cassette was done by use of a lentivirus vector [102]. Production of NGF in the activated state and the therapeutic effect in cell rescue of cholinergic neurons was similar to animals treated with a vector that continuously expressed NGF. More recently, the same group studied the effect of regulated BDNF expression on axonal growth in a rat model of spinal cord injury [103]. Primary fibroblasts that were transduced by a retrovirus carrying a TetOn system to control BDNF or GFP expression were implanted in these rats immediately following the injury of the spinal cord. Regulation of transgene expression was observed for up to 3 months following gene transfer and production of BDNF resulted in strong axonal growth into the lesion site.

4.3.3. Huntington's disease

A rat model of Huntington's disease (HD), in which the striatal injection of quinoloic acid provoked pathologic changes reminiscent to HD pathology, especially the degeneration of striatal neurons, was used by Regulier and colleagues to study the regulated neurotrophic factor expression [104]. Following lentiviral vector-mediated gene transfer of CNTF under the control of the TetOff system, CNTF

expression could be turned on and off by administering Dox via the drinking water, and striatal neurons were protected from degeneration by quinolonic acid.

4.3.4. Parkinson's disease

Different strategies have been developed for the treatment of Parkinson's disease by the use of regulated transgene expression. One possibility is the restoration of regulated dopamine production (which is inhibited in Parkinson's disease) in the striatum through temporal overexpression of tyrosine hydroxylase (TH), the rate limiting enzyme in dopamine biosynthesis. A second strategy would be the expression of neurotrophic factors, which protect dopaminergic neurons in the striatum from degeneration during the disease. For example, the neurotrophic factor GDNF has been shown to improve the phenotype of Parkinson's disease when administered over long time or following continuous expression in the brain. However, the continuous overexpression of GDNF in the brain leads to adverse effects, including the downregulation of tyrosine hydroxylase (TH) [105,106].

The group of Vogel and colleagues used a lentiviral vector for the transfer of an expression cassette containing TH or LU controlled by the TetOn (rtTA-M2) system [107]. The authors reported an inducibility of transgene expression by two orders of magnitude after 10 days of Dox administration via the drinking water at a dose of 3 mg/ml. Another group transplanted a neuronal cell line (PC12), which was stably transfected with a TetOff system for regulated production of TH, into the striatum of rats [108]. The production of dopamine was partially controlled over a period of 2 months in this study.

In order to attempt a regulated expression of neurotrophic factors, the expression of GDNF was placed under the control of the TetOn system employing the rtTA-M2 transactivator in a two vector system [61]. To prove the feasibility of this strategy, two vectors, one encoding the reporter gene *GFP* and the second encoding the TetOn system, were initially injected in a 1:2 ratio into the striatum. Dox was given via the drinking water (1 mg/ml) over 4 weeks, and GFP expressing cells were found only in induced animals. Injection of two vectors expressing GDNF under control of the TetOn system resulted in a 7-fold difference of GDNF expression between non-induced and induced animals. Background levels were elevated, indicating a rather strong leakage of the system. Diluting the vector stock by 10 resulted in lower GDNF levels in the induced state, but also almost undetectable GDNF expression in the off state. Upon withdrawal of Dox from the drinking water, GDNF protein levels were completely reduced within 2 weeks and TH protein expression returned to normal within 2–8 weeks, indicating that GDNF-induced downregulation of TH is a reversible event.

The use of the TetR-KRAB system for the regulation of GDNF expression following lentiviral vector-mediated gene transfer was studied by Szulc et al. [45]. Lasting over a period of 8 weeks, they were able to turn on and off GDNF expression with a 9-fold difference following Dox administration via the drinking water (0.2 mg/ml).

Another strategy to express GDNF was developed using the autoregulatory loop to control transgene expression following injection of a single AAV vector [62–64]. Initially, it was shown, that the expression of GFP could be induced in the rat brain through the administration of Dox supplemented food which displayed an 80-fold increase in the mean total fluorescence intensity [62]. After the introduction of the GDNF cDNA into the vector and injection into the striatum, animals were continuously induced with 0.6 mg/ml Dox via the drinking water. GDNF expression was increased 12-fold in induced animals and remained undistinguishable in non-induced animals. The introduction of the WPRE sequence behind the *GDNF* gene did not increase protein levels in the induced state whereas basal levels were 2.5-fold higher [63]. The biological activity of the transgenic GDNF was proven by the downregulation of TH in dopaminergic terminals of neurons in induced animals. Recently, the difference in the expression pattern between expression cassettes containing the TetOn system or

the CMV promoter driving GFP expression following AAV-mediated gene transfer was assessed by the group and found to be different [64].

4.3.5. Brain cancer

A widely used strategy for the treatment of cancer constitutes in the expression of suicide genes that render cancer cells susceptible to specific antitumour drugs. The combination of HSV-1-thymidine kinase (HSV-1-TK) with gancyclovir (GCV) is the most widely used system in cancer gene therapy. It has been shown that an immunotherapeutic approach that combines the cytotoxic properties of HSV-1-TK, which kills glioma cells in the presence of GCV alone or in combination with the immunostimulatory effects of FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L), is very efficient in eliminating large, intracranial, malignant glioblastoma in rats [109]. However, the use of first generation adenoviral vectors and the detection of an immune response against HSV-1-TK in survivors of glioma cancer demonstrated the need for a regulated expression of the transgene, particularly the “turn off” in case of a successful therapeutic outcome.

In order to meet these challenges, a strategy was developed, in which the regulation of HSV-1-TK expression is mediated by the combined TetOn strategy. The vector to be transferred into the brain parenchyma is a High Capacity adenovirus, which is devoid of all wild type adenoviral sequences and, therefore, should be less immunogenic as compared to previous adenovirus based vector systems.

Initially, β -gal was used as a reporter gene and expressed under the control of the combined TetOn system and rtTA-M2 and rTS-Kid expressions driven either by the human (hCMV) or the mouse (mCMV) cytomegalovirus early promoter element [66]. Within 6 days of Dox administration via the drinking water, transgene expression reached to a maximum and decreased to background levels within 10–14 days of the withdrawal of Dox. As observed in other studies, the expression of β -gal in the induced state was dependent on the dose of Dox administered. Inducibility of transgene expression was the best and background levels the lowest with the mCMV-TetOn system [66,110]. Importantly, the regulated transgene expression was possible even in the presence of a strong systemic immune reaction against adenoviruses, highlighting the possibility to use this system in patients with prior exposure to adenovirus, a common human infection. Therefore, the authors continued to work with the murine promoter to construct an expression cassette that would control the expression of the immunostimulatory protein, Flt3L, using the HC-Ad vector system [110]. A second vector encoded the HSV-1-TK protein, which is toxic only in the presence of GCV, driven by a continuous promoter. Cytotoxic activity would be initiated by the application of GCV. After having shown the tight control of transgene expression in human glioma cells [110], the system was studied in canine glioma cells [111]. The spontaneous development of glioblastoma multiforme in a variety of dog breeds makes these animals a precious large animal model for the development of gene therapy strategies for this disease. Both HC-Ads successfully transduced dog glioma cells and exerted anti-tumoural effects in these cells *in vitro*. Therefore, this strategy may be a possible treatment option for glioblastoma multiforme in dogs, and subsequently in human clinical trials.

An interesting observation made by this group was that immunisation of mice against the reporter gene but not against the transactivators would elicit an immune response and subsequent loss of expression from transduced cells in the brain of mice [65].

4.3.6. Chronic pain

Chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in rats is a model for the development of antinociceptive therapies for neuropathic pain diseases, in which patients suffer from intractable pain. The overproduction of β -endorphin in the brain can reduce pain sensitivity to CCI and therefore might represent a potential therapy for patients suffering from neuropathic pain. A two-plasmid gene

therapy strategy using the TetOff system to regulate expression of pro-opiomelanocortin, which is the precursor gene of β -endorphin, has been developed and tested in the rat model of CCI [112]. Expression of β -endorphin was regulated over a duration of 14 days by intraperitoneal administration of Dox; nociceptive sensitivity was reduced in rats that expressed this protein. In an attempt to develop the strategy into a more clinically relevant setting, the authors produced a three-plasmid strategy coding for the pro-opiomelanocortin gene, the rtTA transactivator and the tTS silencer [113]. The three plasmids were coelectroporated into the spinal cord of rats and the analgesic potential was measured by heat and mechanical sensitivity tests. Expression of β -endorphin was robust upon intraperitoneal Dox administration for a period of 14 days (duration of the experiment).

4.3.7. Stem cells and siRNA regulation

Another strategy for regulated expression of transgenes in the brain is the use of stably transfected embryonic stem cells, whose progeny cells express the transgene following transfer into certain organs [114]. GFP expressing stem cells, in which the expression is controlled by a TetOn system, were implanted into the brain of mice and expression was efficiently controlled by Dox administration over a period of 84 days.

Very recently, the TetOn system was used for the regulated expression of siRNA to block the expression of integrin-linked kinase (ILK) following rAAV-mediated gene transfer into the nucleus accumbens of rats [115]. This conditional knock-down of ILK expression was constructed to study the function of this kinase in normal brain structures. The use of a neuron specific promoter, synapsin 1 gene promoter, to drive rtTA-M2 expression assured highly specific neuronal transgene expression. Within two weeks of Dox administration (3 mg/kg), the expression of ILK was markedly reduced, returning to normal values within 8 days of Dox withdrawal. This study shows that conditional gene silencing can be established in distinct brain regions using rAAV delivered and TetOn-regulated siRNA expression. Such a system could potentially be useful to down-regulate the production of toxic proteins in the brain in certain CNS disorders.

4.4. Regulation of transgene expression in other organs

The possibility of regulated transgene expression was studied by several groups in the liver of rodents and primates, and in rodent models of human hematopoiesis, cancer, and cartilage tissue.

4.4.1. Liver

One strategy to treat patients with Hepatitis C is the systemic administration of the antiviral molecule interferon α (IFN- α). The treatment of this viral infection is not very effective, as the relatively short half-life of the protein in the circulation makes it difficult to obtain sufficient protein levels in the liver over a sustained period. However, expression of IFN- α in the liver following viral vector-mediated gene transfer may constitute an effective treatment option for patients with Hepatitis C. As mentioned above, an inducible gene expression system would be most appropriate in order to avoid the occurrence of potential negative side effects of the expression of such a protein over time.

The TetOn system (rtTA-S2) has been employed to control the expression of IFN- α (HD-Tet-IFN) in the liver of mice following adenoviral vector-mediated gene transfer [116]. After 3 days of Dox administration (200 μ g/ml) via the drinking water, IFN- α concentrations of 4000 U/ml were observed in the serum of HD-Tet-IFN injected mice. Withdrawal of Dox from the drinking water resulted in a rapid decrease of serum IFN- α concentration to undetectable levels within 3 days. The level of IFN- α in the serum of induced mice was dependent on the dose of Dox administered. Finally, the authors tested the effect

of regulated IFN- α expression on the survival rate of mice challenged with a lethal dose of liver toxic coronavirus. IFN- α expression resulted in the prolonged survival of the animals and reduced liver damage due to the activation of the expression of antiviral genes.

Following these encouraging results, the authors aimed to extrapolate their system from the mouse to nonhuman primates [16]. Monkeys of the genus *Sanguinus*, commonly called tamarins, have been proposed to be a surrogate model to study virus induced hepatitis after infection with a flavivirus, GB virus B (GBV-B). To study the effect of IFN- α expression following gene transfer to the liver in this model, an adenoviral vector was developed that controlled the expression of tamarin IFN- α by use of the TetOn (rtTA-S2) system. Following successful demonstration of the functionality of the system in mice and rats, the vector was injected intravenously into 4 monkeys and initially tested for the regulation of IFN- α expression in the liver. At 14 days post-injection, transgene expression was induced for 3 days by oral administration of Dox (10 mg/kg). Two of the monkeys exhibited an 8-to-16 fold increase of IFN- α serum levels, while the other two monkeys showed lower increases of IFN- α in the serum. Within 3–5 days of Dox withdrawal, serum IFN- α levels decreased to baseline levels. The inductions were repeated three times and demonstrated the reinducibility of the system. At day 42 post-injection of the adenoviral vector, IFN- α expression was induced by Dox administration and the animals were challenged with a dose of GBV-B virus. From this moment on, Dox was given continuously until day 150, the end of the experiment, to ensure local liver expression of IFN- α . Even though all animals became viraemic, the expression of IFN- α delayed significantly the onset of the disease. More importantly, all except one animal exhibited low but measurable levels of IFN- α secretion despite inflammation in the expressing organ. The authors discussed various reasons for the lack of complete protection from viral hepatitis compared to the rodent study, including the difference of the maximum level of IFN- α in the serum of induced mice (4000 fold) compared to primates (maximal 32-fold). This is an often observed discrepancy that needs to be taken into account when developing a gene therapy strategy from the mouse to large animal models.

In a different mouse model of chronic hepatitis B virus infection, the regulated expression of IFN- γ was controlled by a TetOn system and delivered systemically into mice by two adenoviral vectors [117]. Liver-specific transgene expression was assured by use of the liver-activated protein promoter (p-LAP). The authors reported low basal expression and tight regulation of IFN- γ expression upon Dox administration via the drinking water.

Hemophilia is a coagulation disorder caused by defective blood clotting factor (FIX) production. In order to treat patients with this disease, the regulated expression of the missing factor in the liver would provide a potential alternative to repeated administration of the protein or prolonged expression without regulatory system.

Vigna and colleagues reported on the regulated expression of FIX in the liver of SCID mice following systemic administration of a single lentiviral vector containing the TetOff system for regulation [118]. In this study, mice were injected with different amounts of the lentiviral vector, and regulation of FIX expression upon Dox administration via the drinking water (50 μ g/ml) was observed over a period of 240 days. Another study employed an adenoviral vector for delivery and the TetOn system for control of FIX expression [119]. Upon delivery of the vector into SCID mice, the expression of FIX could be regulated by oral administration of Dox (200 μ g/ml) via the drinking water for at least 2 months. The group of Mizuguchi and colleagues studied the regulated expression of an adenoviral vector containing the *SEAP* gene under the control of the combined TetOn system in mice [120]. In addition, the regulated expression of lacZ and phospholipase A2 (PLA2) was studied in mice following adenoviral vector injection into the lung (lung-targeted gene transfer) or intravenous administration (liver-targeted gene transfer), respectively [121].

4.4.2. Hematopoietic cells

The expression of transgenes from hematopoietic precursor cells, which can be efficiently transduced *ex vivo*, requires the integration of the expression cassette into the genome. Such systems could potentially be applied to regulate the expression of certain genes in defined lineages of precursor cells during hematopoiesis.

Vigna and colleagues developed a lentivirus vector based system for the regulated expression of GFP and LU in human cord blood CD34+ cells that were engrafted into sublethally irradiated NOD/SCID mice [122]. The Tet-system employed was the TetOff system and kinetics of tTA-mediated control of transgene expression were similar to what had been observed in other studies. To switch the system “off”, Dox was administered via the drinking water (200 µg/ml) and, within 8 days, transgene expression was not detectable. The “on” switch, however, took 4 weeks to completely restore transgene expression in these animals, as the slow clearance of the inducer drug defines the kinetics in this system. A second group developed a lentivirus vector, in which SEAP expression was controlled by different versions of the pure TetOn and combined TetOn system [47]. Based on their observations, the authors proposed the simple TetOn system as the most appropriate regulatory system for the control of transgene expression in the hematopoietic system.

4.4.3. Cancer

As it has been mentioned above (chapter 4.3), a widely used strategy to treat cancer is to introduce a suicide gene, such as HSV-1-TK into cancer cells and, thus, render them susceptible to antitumour drugs, such as GCV.

A strategy based on the HSV-1-TK/GCV system has been developed for the treatment of a human breast cancer model in mice [123–125]. Initially, two plasmids, the first containing the HSV-1-TK gene under control of an inducible promoter and the second containing the rtTA Transactivator, were generated in retroviral vector plasmids [123]. These two vector plasmids were co-transduced into human breast cancer cells (MCF-7) and 7 days following Dox induction, these cells were implanted into mice with severe combined immunodeficiency (SCID) bearing breast cancer xenografts. Following GCV administration, tumour cells bearing the HSV-1-TK produced toxic molecules and were subsequently eradicated from the tissue. More importantly, due to a bystander effect, which is a known effect of HSV-1-TK, adjacent cells from the implanted tumour xenograft were also arrested in their growth and tumour size remarkably decreased. In the following step, the experiments were performed using retroviral vectors based on the above-mentioned plasmids for the transfer of the regulatory system directly into tumour xenografts transplanted in nude mice [125]. Transduced cells were sensitive to GCV beginning at 14 days following retrovirus vector administration. HSV-1-TK mRNA increased significantly in tumour tissue and within 6 weeks, the tumour size decreased remarkably and the treated mice achieved long-term survival. To further adjust the treatment strategy for subsequent use in the clinics, the two-retroviral vector system was replaced by a one vector strategy using rAAV2 virus [124]. Again, direct injection of rAAV2 vectors resulted in GCV sensitivity within the tumour 14 days following vector and GCV administration. Similar results concerning tumour size and HSV-1-TK mRNA levels were observed compared to the retroviral vector study. The authors conclude that the regulated expression of HSV-1-TK together with the administration of GCV may be a useful method for the treatment of breast cancer and other solid tumours.

Another anticancer strategy employs the tumour specific expression of toxic proteins in cancer cells. Gu and colleagues designed an expression cassette, where the tTA transactivator is placed under the control of the human telomere reverse transcriptase (hTERT) promoter and controls the expression of cytotoxic protein Bax [126]. The expression cassette was encapsidated into adenoviral vectors and injected into subcutaneous xenograft tumours in mice, where tumour growth was efficiently suppressed for the period of 38 days (duration

of the experiment). Adenoviral vectors carrying the TetOff or the combined TetOn regulatory systems to drive FasL-GFP expression in tumour cells have been developed by Rubinchik et al. [127].

The generation of stable cell lines, which express siRNA against certain important tumour-associated proteins under the control of the TetOn system, is a third anticancer strategy, where Tet regulated expression systems have been studied *in vivo*. Czauderna and colleagues developed stable human prostate cancer cells containing siRNA directed against subunits of the phosphatidylinositol 3 kinase under a modified TetOn system [128]. Another group developed a stable human colon cancer cell line in which the expression of a receptor for a pro-oncogenic protein, KILLER/DR5, is controlled by the TetOn system [129]. A third group developed HeLa cells, which contained a stably integrated expression cassette composed of the TetOn system driving siRNA expression against human polo-like kinase 1 [130].

4.4.4. Cartilage and bone tissue

Cartilage damage following acute injury or degenerative disorders of the joint are frequent and strategies aimed to regenerating damaged cartilage and bone tissue have been investigated. The expression of growth factors that would stimulate the regeneration of cartilage and bone tissue is a potential treatment method.

In order to control the expression of transgenes in the joint, Uebli and colleagues developed an expression cassette, in which the reporter gene, *lacZ*, was under the control of the TetOn system and transfected it into chondrocytes [131]. These cells were implanted into osteochondral defects in the knees of New Zealand rabbits. Following three weeks of Dox-mediated gene expression, *lacZ* protein could be detected in well integrated implants.

A different strategy involved the use of mesenchymal stem cells, which have been transfected with an expression cassette containing the TetOn system regulating the expression of bone morphogenic protein-2 (BMP-2), a highly potent osteoinductive protein. Upon transplantation of these cells into the radii of osteopenic mice, expression of BMP-2 could be well detected in induced animals and bone formation and regeneration was observed over a duration of up to 4 months [132]. Another group reported that even the short-term induction of BMP-2 expression following intra-articular injection of stem cells, which contained a TetOff controlled expression cassette for BMP-2, resulted in the induction of bone formation in knee tissue [133].

5. Immune response to the TetOn transactivator is observed following gene transfer in the muscle, but not following gene transfer in the retina of nonhuman primates

The Tet-regulatable system was studied by several groups in the last preclinical model, the nonhuman primate, following gene transfer to the muscle [10,12,13] to the retina [17,18], or to the liver [16]. In contrast to what has been observed in the retina, where regulated transgene expression persists for more than 5 years without any apparent cellular or humoral immune response, muscle directed gene transfer exhibited a more differentiated image.

When rtTA was used to regulate the expression of macaque EPO or of SEAP from skeletal muscle, following rAAV or adenovirus-mediated gene transfer, a large majority of individuals developed an immune response to the rtTA protein [10,12,13] (Moullier et al. unpublished data). This immune response was responsible for the rapid loss of rtTA-mediated control of transgene expression due to the destruction of the genetically modified cells and included both reactions, humoral and cellular. Such immune responses occurred even upon using the muscle-specific desmin promoter instead of a ubiquitous promoter to drive rtTA expression (Moullier unpublished data). After the generation of novel rtTA variants, which showed an improved sensitivity to

Dox and reduced background activity, it was hoped that these variants would be less immunogenic in muscle directed gene transfer.

However, when using these variants to regulate transgene expression from the muscle, an immune response to the transactivator was still detectable (Moullier et al., unpublished data). It has been demonstrated that CD8⁺-specific epitopes, which were identified on rtTA, resulted *in vitro* in lysis of rtTA-expressing cells by cytotoxic T lymphocytes. Mutation analysis of the dominant epitope led to the appearance of subdominant epitopes, suggesting that an anti-rtTA immune response could not be prevented by selective engineering of the transactivator [134].

In intramuscularly rAAV-injected nonhuman primates, lymphomonocytic infiltrates associated with myofibre destruction were documented. Phenotypic analysis of the infiltrating cells showed the presence of CD4⁺, CD8⁺ and CD86⁺ cells. Presence of these infiltrates was concomitant with the detection of circulating antibodies against the rtTA protein, and a quantitative reduction of the rAAV copy number at the injection sites. In addition, a weak IFN- γ secretion, specific for the rtTA protein, was detected in AAV vector injected animals using *in vitro* activated lymph node mononuclear cells (LNMC) [10] and in Ad vector injected animals *ex vivo* in fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with the rtTA polypeptide [12]. *In vitro* stimulated PBMC of the injected animals could also specifically lyse target cells expressing the rtTA peptides.

The reason why not all of the injected animals did mount an immune response to the rtTA transactivator remains unknown [10]. The fact that one of the animals injected did not have an immune response to rtTA and developed neutralising antibodies to the rAAV capsid (Moullier et al., unpublished data) indicated that this individual was immunocompetent for other non-self peptides and may have possibly developed a spontaneous tolerance for this particular peptide.

Factors involved in transgene-specific immune response are likely numerous, but depend mainly on the vector system used and the route of administration. For example, when naked plasmids are injected, the chemical formulation of the plasmid DNA, the physical method for injecting the DNA and the dose injected can affect the immune response profile [12]. Regarding the route of rAAV and rAd administration, the poor diffusion of the vectors following intramuscular injection is likely one of the major reasons for the development of transgene-specific immune responses [85,135].

On the contrary, ability of the TetOn system to establish long-term transgene expression regulation was demonstrated in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of rAAV vectors. The fact that no antibody directed against the transactivator rtTA could be detected in the eye or in the serum of these nonhuman primates, and that all animals displayed persistent regulation of EPO secretion for up to 5 years (Fig. 2) [17,18] is consistent with the fact that, unlike skeletal muscle, the retina is likely an immune-privilege site [136].

6. Conclusion

The Tet-regulatable system has now been used in a variety of versions embedded in plasmids, rAAV, adenovirus, lentivirus or HSV vectors to explore the potential of such a system in different organs.

Most applications were experimental studies to demonstrate the feasibility of such an approach but some advanced from the small animal (rodent) model into the large animal model, i.e. the nonhuman primate. This has been in particular the case in muscle, retina or liver directed gene transfer using rAAV or HC-Ad as the transfer vector.

Important information have been derived from these regulated transgene expression studies in large animals. First, the difference between the level of transgene expression in the induced and the non-induced state is smaller in nonhuman primate compared to what is observed in rodents or even *in vitro*. For example in the muscle, a

difference of 100–1000 fold is observed in mice while in nonhuman primate, the difference is 20-to-50 fold.

Second, immune reactions against the TetOn transactivator was detected in nonhuman primate following gene transfer in the muscle. Initial studies in mice did not reveal such immune reactions.

To advance further with these Tet-regulatable systems, several milestones need to be achieved. Concerning the muscle directed gene transfer approach, the problem of the immune reaction against the transactivator needs to be overcome. The imminent step in brain directed gene therapy studies is to extrapolate the results from the rat model to large animal models in order to evaluate, in a clinically relevant setting, the immune status and efficiency of the Tet-regulatable systems. This may soon be the case for the brain cancer study, where a canine model for glioblastoma multiforme exists. Regarding gene transfer to the retina, clinically relevant disease models should now be evaluated, using vectors in which the Tet-regulatable system controls the expression of the therapeutic transgene.

References

- [1] M. Gossen, H. Bujard, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 5547–5551.
- [2] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, H. Bujard, Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells, *Science* 268 (1995) 1766–1769.
- [3] V.M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J.F. Amara, T. Keenan, S.R. Magari, T. Phillips, N.L. Courage, F. Cerasoli Jr., D.A. Holt, M. Gilman, A humanized system for pharmacologic control of gene expression, *Nat. Med.* 2 (1996) 1028–1032.
- [4] E. Vegeto, G.F. Allan, W.T. Schrader, M.J. Tsai, D.P. McDonnell, B.W. O'Malley, The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor, *Cell* 69 (1992) 703–713.
- [5] G. Roscilli, C.D. Rinaudo, M. Cimino, E. Sporeno, S. Lamartina, G. Ciliberto, C. Toniatti, Long-term and tight control of gene expression in mouse skeletal muscle by a new hybrid human transcription factor, *Mol. Ther.* 6 (2002) 653–663.
- [6] L.R. Karns, A. Kisielewski, K.M. Gulding, J.M. Seraj, D. Theodorescu, Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts, *BMC Biotechnol.* 1 (2001) 11.
- [7] S.R. Palli, M.Z. Kapitskaya, M.B. Kumar, D.E. Cress, Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1308–1315.
- [8] C. Toniatti, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto, Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems, *Gene Ther.* 11 (2004) 649–657.
- [9] N. Vilaboa, R. Voellmy, Regulatable gene expression systems for gene therapy, *Curr. Gene Ther.* 6 (2006) 421–438.
- [10] D. Favre, V. Blouin, N. Provost, R. Spisek, F. Porrot, D. Bohl, F. Marme, Y. Chereil, A. Salvetti, B. Hurtrel, J.M. Heard, Y. Riviere, P. Moullier, 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 (2002) 11605–11611.
- [11] A. Auricchio, V.M. Rivera, T. Clackson, E.E. O'Connor, A.M. Maguire, M.J. Tolentino, J. Bennett, J.M. Wilson, Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye, *Mol. Ther.* 6 (2002) 238–242.
- [12] M. Latta-Mahieu, M. Rolland, C. Caillet, M. Wang, P. Kennel, I. Mahfouz, I. Loquet, J.F. Dedieu, A. Mahfoudi, E. Trannoy, V. Thuillier, Gene transfer of a chimeric transactivator is immunogenic and results in short-lived transgene expression, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1611–1620.
- [13] P. Chenuaud, T. Larcher, J.E. Rabinowitz, N. Provost, B. Joussemet, H. Bujard, R.J. Samulski, D. Favre, P. Moullier, 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 (2004) 410–418.
- [14] C. Leberher, A. Auricchio, A.M. Maguire, V.M. Rivera, W. Tang, R.L. Grant, T. Clackson, J. Bennett, J.M. Wilson, Long-term inducible gene expression in the eye via adeno-associated virus gene transfer in nonhuman primates, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 178–186.
- [15] V.M. Rivera, G.P. Gao, R.L. Grant, M.A. Schnell, P.W. Zoltick, L.W. Rozamus, T. Clackson, J.M. Wilson, Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer, *Blood* 105 (2005) 1424–1430.
- [16] L. Auricchio, A. De Tomassi, N. La Monica, G. Ciliberto, C. Traboni, F. Palombo, Regulated and liver-specific tamarin alpha interferon gene delivery by a helper-dependent adenoviral vector, *J. Virol.* 79 (2005) 6772–6780.
- [17] K. Stieger, G. Le Meur, F. Lasne, M. Weber, J.Y. Deschamps, D. Nivard, A. Mendes-Madeira, N. Provost, L. Martin, P. Moullier, F. Rolling, Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors, *Mol. Ther.* 13 (2006) 967–975.
- [18] K. Stieger, A. Mendes-Madeira, G.L. Meur, M. Weber, J.Y. Deschamps, D. Nivard, N. Provost, P. Moullier, F. Rolling, Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases, *Gene Ther.* 14 (2007) 1668–1673.

- [19] A. Wissmann, I. Meier, L.V. Wray Jr., M. Geissendorfer, W. Hillen, Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 4253–4266.
- [20] P. Orth, F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, W. Hinrichs, Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping, *J. Mol. Biol.* 279 (1998) 439–447.
- [21] U. Deuschle, W.K. Meyer, H.J. Thiesen, Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 1907–1914.
- [22] P.A. Furth, L. St Onge, H. Boger, P. Gruss, M. Gossen, A. Kistner, H. Bujard, L. Hennighausen, Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 9302–9306.
- [23] U. Baron, M. Gossen, H. Bujard, Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 2723–2729.
- [24] A. Kistner, M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert, H. Bujard, Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 10933–10938.
- [25] U. Baron, H. Bujard, Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances, *Methods. Enzymol.* 327 (2000) 401–421.
- [26] S. Urlinger, U. Baron, M. Thellmann, M.T. Hasan, H. Bujard, W. Hillen, Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7963–7968.
- [27] S. Lamartina, G. Roscilli, C.D. Rinaudo, E. Sporeno, L. Silvi, W. Hillen, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto, C. Toniatti, Stringent control of gene expression *in vivo* by using novel doxycycline-dependent trans-activators, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 199–210.
- [28] D. Favre, N. Provost, V. Blouin, G. Blanco, Y. Chereil, A. Salvetti, P. Moulletier, Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle, *Mol. Ther.* 4 (2001) 559–566.
- [29] E.J. Bellefroid, D.A. Poncelet, P.J. Lecocq, O. Revelant, J.A. Martial, The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 3608–3612.
- [30] J.F. Margolin, J.R. Friedman, W.K. Meyer, H. Vissing, H.J. Thiesen, F.J. Rauscher III, Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 4509–4513.
- [31] R. Witzgall, E. O'Leary, A. Leaf, D. Onaldi, J.V. Bonventre, The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 4514–4518.
- [32] R. Witzgall, R. Volk, R.S. Yeung, J.V. Bonventre, Genomic structure and chromosomal location of the rat gene encoding the zinc finger transcription factor Kid-1, *Genomics* 20 (1994) 203–209.
- [33] B. Senatore, A. Cafieri, I. Di Marino, M. Rosati, P.P. Di Nocera, G. Grimaldi, A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the Kruppel-associated/finger preceding box of zinc finger proteins, *Gene* 234 (1999) 381–394.
- [34] R.F. Ryan, D.C. Schultz, K. Ayyanathan, P.B. Singh, J.R. Friedman, W.J. Fredericks, F.J. Rauscher III, KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatin and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 4366–4378.
- [35] G. Pengue, L. Lania, Kruppel-associated box-mediated repression of RNA polymerase II promoters is influenced by the arrangement of basal promoter elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 1015–1020.
- [36] E. Matsuda, Y. Agata, M. Sugai, T. Katakai, H. Gonda, A. Shimizu, Targeting of Kruppel-associated box-containing zinc finger proteins to centromeric heterochromatin. Implication for the gene silencing mechanisms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14222–14229.
- [37] R. Urrutia, KRAB-containing zinc-finger repressor proteins, *Genome Biol.* 4 (2003) 231.
- [38] S.P. Sripathy, J. Stevens, D.C. Schultz, The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 8623–8638.
- [39] D.C. Schultz, K. Ayyanathan, D. Negorev, G.G. Maul, F.J. Rauscher III, SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins, *Genes Dev.* 16 (2002) 919–932.
- [40] D.C. Schultz, J.R. Friedman, F.J. Rauscher III, Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD, *Genes Dev.* 15 (2001) 428–443.
- [41] M. Wiznerowicz, D. Trono, Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference, *J. Virol.* 77 (2003) 8957–8961.
- [42] K. Rittner, H. Schultz, A. Pavirani, M. Mehtali, Conditional repression of the E2 transcription unit in E1-E3-deleted adenoviral vectors is correlated with a strong reduction in viral DNA replication and late gene expression *in vitro*, *J. Virol.* 71 (1997) 3307–3311.
- [43] H. Wang, H. Cao, M. Wohlfahrt, H.P. Kiem, A. Lieber, Tightly regulated gene expression in human Haematopoietic stem cells after transduction with helper-dependent Ad5/35 vectors, *Exp. Hematol.* 36 (2008) 823–831.
- [44] C. Rossi, D. Gibellini, G. Barbanti-Brodano, M. Betti, C. Boarini, G. Pengue, L. Lania, A. Caputo, Transiently transfected and stably integrated HIV-1 LTR responds differentially to the silencing activity of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repressor domain, *J. Med. Virol.* 58 (1999) 264–272.
- [45] J. Szulc, M. Wiznerowicz, M.O. Sauvain, D. Trono, P. Aebischer, A versatile tool for conditional gene expression and knockdown, *Nat. Methods* 3 (2006) 109–116.
- [46] S. Freundlieb, C. Schirra-Muller, H. Bujard, A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells, *J. Gene Med.* 1 (1999) 4–12.
- [47] I. Barde, M.A. Zanta-Boussif, S. Paisant, M. Leboeuf, P. Rameau, C. Delenda, O. Danos, Efficient control of gene expression in the Haematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector, *Mol. Ther.* 13 (2006) 382–390.
- [48] R.P. Haberman, T.J. McCown, R.J. Samulski, Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer, *Gene Ther.* 5 (1998) 1604–1611.
- [49] B. Sommer, C. Rinsch, E. Payen, B. Dalle, B. Schneider, N. Deglon, A. Henri, Y. Beuzard, P. Aebischer, Long-term doxycycline-regulated secretion of erythropoietin by encapsulated myoblasts, *Mol. Ther.* 6 (2002) 155–161.
- [50] H.L. Fitzsimons, J.M. McKenzie, M.J. Duling, Insulators coupled to a minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain, *Gene Ther.* 8 (2001) 1675–1681.
- [51] D.J. Gould, M. Berenstein, H. Dreja, F. Ledda, O.L. Podhajcer, Y. Chernajovsky, A novel doxycycline inducible autoregulatory plasmid which displays “on”/“off” regulation suited to gene therapy applications, *Gene Ther.* 7 (2000) 2061–2070.
- [52] D. Markusic, R. Oude-Elferink, A.T. Das, B. Berkhout, J. Seppen, Comparison of single regulated lentiviral vectors with rTA expression driven by an autoregulatory loop or a constitutive promoter, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e63.
- [53] K.N. Agwuh, A. MacGowan, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines, *J. Antimicrob. Chemother.* 58 (2006) 256–265.
- [54] U. Ljostad, E. Skogvoll, R. Eikeland, R. Midgard, T. Skarpaas, A. Berg, A. Mygland, Oral doxycycline versus intravenous ceftriaxone for European Lyme neuroborreliosis: a multicentre, non-inferiority, double-blind, randomised trial, *Lancet Neurol.* 7 (2008) 690–695.
- [55] F. Nosten, R. McGready, U. d'Alessandro, A. Bonell, F. Verhoeff, C. Menendez, T. Mutabingwa, B. Brabin, Antimalarial drugs in pregnancy: a review, *Curr. Drug Saf.* 1 (2006) 1–15.
- [56] J.P. Powell, R.P. Wenzel, Antibiotic options for treating community-acquired MRSA, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6 (2008) 299–307.
- [57] B. Berman, O.A. Perez, D. Zell, Update on rosacea and anti-inflammatory-dose doxycycline, *Drugs Today (Barc.)* 43 (2007) 27–34.
- [58] B. Berman, D. Zell, Subantimicrobial dose doxycycline: a unique treatment for rosacea, *Cutis* 75 (2005) 19–24.
- [59] B. Sloan, N. Scheinfeld, The use and safety of doxycycline hyclate and other second-generation tetracyclines, *Expert Opin. Drug Saf.* 7 (2008) 571–577.
- [60] K. Eger, M. Hermes, K. Uhlemann, S. Rodewald, J. Ortwein, M. Brulport, A.W. Bauer, W. Schormann, F. Lupatsch, I.B. Schiffer, C.K. Heimerdinger, S. Gebhard, C. Spangenberg, D. Prawitt, T. Trost, B. Zabel, C. Sauer, B. Tanner, H. Kolbl, U. Krugel, H. Franke, P. Illes, P. Madaj-Sterba, E.O. Bockamp, T. Beckers, J.G. Hengstler, 4-Epidoxycycline: an alternative to doxycycline to control gene expression in conditional mouse models, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 979–986.
- [61] B. Georgievskaja, J. Jakobsson, E. Persson, C. Ericson, D. Kirik, C. Lundberg, Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector, *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 934–944.
- [62] A. Chtarto, H.U. Bender, C.O. Hanemann, T. Kemp, E. Lehtonen, M. Levivier, J. Brotchi, T. Velu, L. Tenenbaum, Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector, *Gene Ther.* 10 (2003) 84–94.
- [63] A. Chtarto, X. Yang, O. Bockstael, C. Melas, D. Blum, E. Lehtonen, L. Abeloos, J.M. Jaspard, M. Levivier, J. Brotchi, T. Velu, L. Tenenbaum, Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector, *Exp. Neurol.* 204 (2007) 387–399.
- [64] O. Bockstael, A. Chtarto, J. Wakkinen, X. Yang, C. Melas, M. Levivier, J. Brotchi, L. Tenenbaum, Differential transgene expression profiles from rAAV2/1 vectors using the TetOn and CMV promoters in the rat brain, *Hum. Gene Ther.* 2 (2008) 2.
- [65] W. Xiong, M. Candolfi, K.M. Kroeger, M. Puntel, S. Mondkar, D. Laroque, C. Liu, J.F. Curtin, D. Palmer, P. Ng, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Immunization against the transgene but not the TetOn switch reduces expression from gutless adenoviral vectors in the brain, *Mol. Ther.* 16 (2008) 343–351.
- [66] W. Xiong, S. Goverdhana, S.A. Sciascia, M. Candolfi, J.M. Zirger, C. Barcia, J.F. Curtin, G.D. King, G. Jaita, C. Liu, K. Kroeger, H. Agadjanian, L. Medina-Kauwe, D. Palmer, P. Ng, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Regulatable gutless adenoviral vectors sustain inducible transgene expression in the brain in the presence of an immune response against adenoviruses, *J. Virol.* 80 (2006) 27–37.
- [67] G.I. Fishman, M.L. Kaplan, P.M. Buttrick, Tetracycline-regulated cardiac gene expression *in vivo*, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1864–1868.
- [68] K.G. Rendahl, S.E. Leff, G.R. Otten, S.K. Spratt, D. Bohl, M. Van Roey, B.A. Donahue, L.K. Cohen, R.J. Mandel, O. Danos, R.O. Snyder, Regulation of gene expression *in vivo* following transduction by two separate rAAV vectors, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 757–761.
- [69] D. Bohl, N. Naffakh, J.M. Heard, Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts, *Nat. Med.* 3 (1997) 299–305.
- [70] D. Bohl, A. Salvetti, P. Moulletier, J.M. Heard, Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector, *Blood* 92 (1998) 1512–1517.
- [71] C. Serguera, D. Bohl, E. Rolland, P. Prevost, J.M. Heard, Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 375–383.
- [72] S. Samakoglu, D. Bohl, J.M. Heard, Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled EPO delivery from muscles, *Mol. Ther.* 6 (2002) 793–803.
- [73] K.G. Rendahl, D. Quiroz, M. Ladner, M. Coyne, J. Seltzer, W.C. Manning, J.A. Escobedo, Tightly regulated long-term erythropoietin expression *in vivo* using

- tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 335–342.
- [74] S. Lamartina, L. Silvi, G. Roscilli, D. Casimiro, A.J. Simon, M.E. Davies, J.W. Shiver, C.D. Rinaudo, I. Zampaglione, E. Fattori, S. Colloca, O. Gonzalez Paz, R. Laufer, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto, C. Toniatti, Construction of an rTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates, *Mol. Ther.* 7 (2003) 271–280.
- [75] A.M. Lena, P. Giannetti, E. Sporeno, G. Ciliberto, R. Savino, Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector, *J. Gene Med.* 7 (2005) 1086–1096.
- [76] V. Salucci, A. Scarito, L. Aurisicchio, S. Lamartina, G. Nicolaus, S. Giampaoli, O. Gonzalez-Paz, C. Toniatti, H. Bujard, W. Hillen, G. Ciliberto, F. Palombo, Tight control of gene expression by a helper-dependent adenoviral vector carrying the rTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system, *Gene Ther.* 9 (2002) 1415–1421.
- [77] P. Fender, L. Jeanson, M.A. Ivanov, P. Colin, J. Mallet, J.F. Dedieu, M. Latta-Mahieu, Controlled transgene expression by E1-E4-defective adenoviral vectors harbouring a “Tet-on” switch system, *J. Gene Med.* 4 (2002) 668–675.
- [78] A. Sander, A. Guth, H.R. Brenner, V. Witzemann, Gene transfer into individual muscle fibres and conditional gene expression in living animals, *Cell Tissue Res.* 301 (2000) 397–403.
- [79] N. Perez, P. Plence, V. Millet, D. Greuet, C. Minot, D. Noel, O. Danos, C. Jorgensen, F. Apparailly, Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after *in vivo* intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 2161–2172.
- [80] F. Apparailly, V. Millet, D. Noel, C. Jacquet, J. Sany, C. Jorgensen, Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1179–1188.
- [81] J. Dhawan, T.A. Rando, S.L. Elson, H. Bujard, H.M. Blau, Tetracycline-regulated gene expression following direct gene transfer into mouse skeletal muscle, *Somat. Cell Mol. Genet.* 21 (1995) 233–240.
- [82] D. Goukassian, A. Diez-Juan, T. Asahara, P. Schratzberger, M. Silver, T. Murayama, J.M. Isner, V. Andres, Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis, *FASEB J.* 15 (2001) 1877–1885.
- [83] D. Martel-Renoir, V. Trochon-Joseph, A. Galaup, C. Bouquet, F. Grisicelli, P. Opolon, D. Opolon, E. Connauld, L. Mir, M. Perrecaudet, Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible system: tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect, *Mol. Ther.* 8 (2003) 425–433.
- [84] S. Agha-Mohammadi, M. O'Malley, A. Etamad, Z. Wang, X. Xiao, M.T. Lotze, Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness, *J. Gene Med.* 6 (2004) 817–828.
- [85] C. Le Guiner, K. Stieger, R.O. Snyder, F. Rolling, P. Moullier, Immune responses to gene product of inducible promoters, *Curr. Gene Ther.* 7 (2007) 334–346.
- [86] R. Wen, Y. Song, S. Kjellstrom, A. Tanikawa, Y. Liu, Y. Li, L. Zhao, R.A. Bush, A.M. Laties, P.A. Sieving, Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor, *J. Neurosci.* 26 (2006) 13523–13530.
- [87] B. Oosthuysen, L. Moons, E. Storkebaum, H. Beck, D. Nuyens, K. Brusselmans, J. Van Dorpe, P. Hellings, M. Gorselink, S. Heymans, G. Theilmeier, M. Dewerchin, V. Laudenbach, P. Vermynen, H. Raat, T. Acker, V. Vlemminckx, L. Van Den Bosch, N. Cashman, H. Fujisawa, M.R. Drost, R. Sciote, F. Bruyninckx, D.J. Hicklin, C. Ince, P. Gressens, F. Lupu, K.H. Plate, W. Robberecht, J.M. Herbert, D. Collen, P. Carmeliet, Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration, *Nat. Genet.* 28 (2001) 131–138.
- [88] P.A. Campochiaro, Molecular targets for retinal vascular diseases, *J. Cell. Physiol.* 210 (2007) 575–581.
- [89] L.H. McGee Sanftner, K.G. Rendahl, D. Quiroz, M. Coyne, M. Ladner, W.C. Manning, J.G. Flannery, Recombinant AAV-mediated delivery of a Tet-inducible reporter gene to the rat retina, *Mol. Ther.* 3 (2001) 688–696.
- [90] S. Folliot, D. Briot, H. Conrath, N. Provost, Y. Chereil, P. Moullier, F. Rolling, Sustained tetracycline-regulated transgene expression *in vivo* in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector, *J. Gene Med.* 5 (2003) 493–501.
- [91] J.R. Smith, C. Verwaerde, F. Rolling, M.C. Naud, A. Delanoye, B. Thillaye-Goldenberg, F. Apparailly, Y. De Kozak, Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 1037–1046.
- [92] T.C. Harding, B.J. Geddes, D. Murphy, D. Knight, J.B. Uney, Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system, *Nat. Biotechnol.* 16 (1998) 553–555.
- [93] O. Corti, A. Sanchez-Capelo, P. Colin, N. Hanoun, M. Hamon, J. Mallet, Long-term doxycycline-controlled expression of human tyrosine hydroxylase after direct adenovirus-mediated gene transfer to a rat model of Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 12120–12125.
- [94] J.R. Smith-Arica, A.E. Morelli, A.T. Larregina, J. Smith, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encoded combined transcriptional targeting and inducible transgene expression, *Mol. Ther.* 2 (2000) 579–587.
- [95] T. Kafri, H. van Praag, F.H. Gage, I.M. Verma, Lentiviral vectors: regulated gene expression, *Mol. Ther.* 1 (2000) 516–521.
- [96] F. Yao, C. Theopold, D. Hoeller, O. Bleiziffer, Z. Lu, Highly efficient regulation of gene expression by tetracycline in a replication-defective herpes simplex viral vector, *Mol. Ther.* 13 (2006) 1133–1141.
- [97] L. Jiang, S. Rampalli, D. George, C. Press, E.G. Bremer, M.R. O'Gorman, M.C. Bohn, Tight regulation from a single Tet-off rAAV vector as demonstrated by flow cytometry and quantitative, real-time PCR, *Gene Ther.* 11 (2004) 1057–1067.
- [98] G.S. Ralph, A. Bienemann, T.C. Harding, M. Hopton, J. Henley, J.B. Uney, Targeting of tetracycline-regulatable transgene expression specifically to neuronal and glial cell populations using adenoviral vectors, *NeuroReport* 11 (2000) 2051–2055.
- [99] J.K. Koponen, H. Kankkonen, J. Kannasto, T. Wirth, W. Hillen, H. Bujard, S. Yla-Herttuala, Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rTA2S-M2 shows a tight control of gene expression *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.* 10 (2003) 459–466.
- [100] B. Liu, S. Wang, M. Brenner, J.F. Paton, S. Kasparov, Enhancement of cell-specific transgene expression from a Tet-Off regulatory system using a transcriptional amplification strategy in the rat brain, *J. Gene Med.* 10 (2008) 583–592.
- [101] A. Blesch, J.M. Conner, M.H. Tuszynski, Modulation of neuronal survival and axonal growth *in vivo* by tetracycline-regulated neurotrophin expression, *Gene Ther.* 8 (2001) 954–960.
- [102] A. Blesch, J. Conner, A. Pfeifer, M. Gasmí, A. Ramirez, W. Britton, R. Alfa, I. Verma, M.H. Tuszynski, Regulated lentiviral NGF gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons, *Mol. Ther.* 11 (2005) 916–925.
- [103] A. Blesch, M.H. Tuszynski, Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury, *J. Neurosci.* 27 (2007) 10535–10545.
- [104] E. Regulier, L. Pereira de Almeida, B. Sommer, P. Aebischer, N. Deglon, Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 1981–1990.
- [105] B. Georgievská, D. Kirik, A. Bjorklund, Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor using a lentiviral vector induces time- and dose-dependent downregulation of tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system, *J. Neurosci.* 24 (2004) 6437–6445.
- [106] B. Georgievská, D. Kirik, C. Rosenblad, C. Lundberg, A. Bjorklund, Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastratial GDNF gene transfer using a lentiviral vector, *NeuroReport* 13 (2002) 75–82.
- [107] R. Vogel, L. Amar, A.D. Thi, P. Saillour, J. Mallet, A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain, *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 157–165.
- [108] K. Kobayashi, T. Yasuhara, T. Agari, K. Muraoka, M. Kameda, W. Ji Yuan, H. Hayase, T. Matsui, Y. Miyoshi, T. Shingo, I. Date, Control of dopamine-secretion by Tet-Off system in an *in vivo* model of parkinsonian rat, *Brain Res.* 1102 (2006) 1–11.
- [109] R.A. Dewey, G. Morrissey, C.M. Cowsill, D. Stone, F. Bolognani, N.J. Dodd, T.D. Southgate, D. Klatzmann, H. Lassmann, M.G. Castro, P.R. Lowenstein, Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat. Med.* 5 (1999) 1256–1263.
- [110] M. Candolfi, J.F. Curtin, W.D. Xiong, K.M. Kroeger, C. Liu, A. Rentsendorj, H. Agadjanian, L. Medina-Kauwe, D. Palmer, P. Ng, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Effective high-capacity gutless adenoviral vectors mediate transgene expression in human glioma cells, *Mol. Ther.* 14 (2006) 371–381.
- [111] M. Candolfi, G.E. Pluhar, K. Kroeger, M. Puntel, J. Curtin, C. Barcia, A.K. Muhammad, W. Xiong, C. Liu, S. Mondkar, W. Kuoy, T. Kang, E.A. McNeil, A.B. Freese, J.R. Ohlfest, P. Moore, D. Palmer, P. Ng, J.D. Young, P.R. Lowenstein, M.G. Castro, Optimization of adenoviral vector-mediated transgene expression in the canine brain *in vivo*, and in canine glioma cells *in vitro*, *Neuro Oncol.* 9 (2007) 245–258.
- [112] C.M. Wu, M.W. Lin, J.T. Cheng, Y.M. Wang, Y.W. Huang, W.Z. Sun, C.R. Lin, Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats, *Gene Ther.* 11 (2004) 933–940.
- [113] K.H. Chen, C.H. Wu, C.C. Tseng, J.M. Shiau, C.T. Lee, C.R. Lin, Intrathecal coelectrotransfer of a tetracycline-inducible, three-plasmid-based system to achieve tightly regulated antinociceptive gene therapy for mononeuropathic rats, *J. Gene Med.* 10 (2008) 208–216.
- [114] X. Xia, M. Ayala, B.R. Thiede, S.C. Zhang, *In vitro*- and *in vivo*-induced transgene expression in human embryonic stem cells and derivatives, *Stem Cells* 26 (2008) 525–533.
- [115] Q. Chen, X. Xiong, T.H. Lee, Y. Liu, Q.A. Sun, W. Wetsel, X. Zhang, Adeno-associated virus-mediated ILK gene silencing in the rat NAc core, *J. Neurosci. Methods* 173 (2008) 208–214.
- [116] L. Aurisicchio, H. Bujard, W. Hillen, R. Cortese, G. Ciliberto, N. La Monica, F. Palombo, Regulated and prolonged expression of miFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenoviral vector, *Gene Ther.* 8 (2001) 1817–1825.
- [117] J. Dumortier, K. Schonig, H. Oberwinkler, R. Low, T. Giese, H. Bujard, P. Schirmacher, U. Protzer, Liver-specific expression of interferon gamma following adenoviral gene transfer controls hepatitis B virus replication in mice, *Gene Ther.* 12 (2005) 668–677.
- [118] E. Vigna, M. Amendola, F. Benedicenti, A.D. Simmons, A. Follenzi, L. Naldini, Efficient Tet-dependent expression of human factor IX *in vivo* by a new self-regulating lentiviral vector, *Mol. Ther.* 11 (2005) 763–775.
- [119] M.A. Srour, H. Fechner, X. Wang, U. Siemietzki, T. Albert, J. Oldenburg, P. Hanfland, W. Poller, H.H. Brackmann, R. Schwaab, Regulation of human factor IX expression using doxycycline-inducible gene expression system, *Thromb. Haemost.* 90 (2003) 398–405.
- [120] H. Mizuguchi, Z.L. Xu, F. Sakurai, T. Mayumi, T. Hayakawa, Tight positive regulation of transgene expression by a single adenoviral vector containing the rTA and rTS expression cassettes in separate genome regions, *Hum. Gene Ther.* 14 (2003) 1265–1277.

- [121] U.J. Tietge, K.F. Kozarsky, M.H. Donahee, D.J. Rader, A tetracycline-regulated adenoviral expression system for *in vivo* delivery of transgenes to lung and liver, *J. Gene Med.* 5 (2003) 567–575.
- [122] E. Vigna, S. Cavaliere, L. Ailles, M. Geuna, R. Loew, H. Bujard, L. Naldini, Robust and efficient regulation of transgene expression *in vivo* by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors, *Mol. Ther.* 5 (2002) 252–261.
- [123] W.X. Hu, Z.J. Zeng, S.Q. Luo, Q. Chen, Suicide gene therapy of human breast cancer in SCID mice model by the regulation of Tet-On, *Chin. Med. J. (Engl.)* 117 (2004) 434–439.
- [124] Z.B. Li, Z.J. Zeng, Q. Chen, S.Q. Luo, W.X. Hu, Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer, *BMC Cancer* 6 (2006) 66.
- [125] Z.J. Zeng, Z.B. Li, S.Q. Luo, W.X. Hu, Retrovirus-mediated tk gene therapy of implanted human breast cancer in nude mice under the regulation of Tet-On, *Cancer Gene Ther.* 13 (2006) 290–297.
- [126] J. Gu, L. Zhang, X. Huang, T. Lin, M. Yin, K. Xu, L. Ji, J.A. Roth, B. Fang, A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific Bax gene expression and cell killing *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene* 21 (2002) 4757–4764.
- [127] S. Rubinchik, J. Woraratanadharm, H. Yu, J.Y. Dong, New complex Ad vectors incorporating both rTA and tTS deliver tightly regulated transgene expression both *in vitro* and *in vivo*, *Gene Ther.* 12 (2005) 504–511.
- [128] F. Czauderna, A. Santel, M. Hinz, M. Fechtner, B. Durieux, G. Fisch, F. Leenders, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) e127.
- [129] S. Wang, W.S. El-Deiry, Inducible silencing of KILLER/DR5 *in vivo* promotes bioluminescent colon tumor xenograft growth and confers resistance to chemotherapeutic agent 5-fluorouracil, *Cancer Res.* 64 (2004) 6666–6672.
- [130] S. Kappel, Y. Matthes, B. Zimmer, M. Kaufmann, K. Strebhardt, Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 4527–4536.
- [131] P. Uebliacker, B. Wagner, A. Kruger, S. Vogt, G. DeSantis, E. Kennerknecht, T. Brill, M. Hillemanns, G.M. Salzmann, A.B. Imhoff, C. Plank, B. Gansbacher, V. Martinek, Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects, *Osteoarthr. Cartil.* 12 (2004) 711–719.
- [132] I.K. Moutsatsos, G. Turgeman, S. Zhou, B.G. Kurkalli, G. Pelled, L. Tzur, P. Kelley, N. Stumm, S. Mi, R. Muller, Y. Zilberman, D. Gazit, Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration, *Mol. Ther.* 3 (2001) 449–461.
- [133] D. Noel, D. Gazit, C. Bouquet, F. Apparailly, C. Bony, P. Ponce, V. Millet, G. Turgeman, M. Perricaudet, J. Sany, C. Jorgensen, Short-term BMP-2 expression is sufficient for *in vivo* osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 22 (2004) 74–85.
- [134] F. Ginhoux, S. Turbant, D.A. Gross, J. Poupiot, T. Marais, Y. Lone, F.A. Lemonnier, H. Firat, N. Perez, O. Danos, J. Davoust, HLA-A*0201-restricted cytolytic responses to the rTA transactivator dominant and cryptic epitopes compromise transgene expression induced by the tetracycline on system, *Mol. Ther.* 10 (2004) 279–289.
- [135] A. Toromanoff, Y. Cherel, M. Guilbaud, M. Penaud-Budloo, R.O. Snyder, M.E. Haskins, J.Y. Deschamps, L. Guigand, G. Podevin, V.R. Arruda, K.A. High, H.H. Stedman, F. Rolling, I. Anegon, P. Moullier, C. Le Guiner, Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle, *Mol. Ther.* 16 (2008) 1291–1299.
- [136] J.W. Streilein, Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature, *Nat. Rev., Immunol.* 3 (2003) 879–889.

TITRE DE LA THESE :

« Optimisation du transfert de gène dans la rétine par vecteur adéno-associé »

RESUME DE LA THESE :

Le transfert de gène *in vivo* dans la rétine est réalisé le plus souvent par l'administration d'un vecteur viral recombinant. Les virus adéno-associés recombinant (AAVr) constituent des vecteurs de choix, car ils permettent une expression forte et stable du transgène dans la rétine, tout en étant faiblement immunogène et sans induire d'effets cytopathique ou cancérigène. L'efficacité du transfert de gène dans la rétine, comme dans d'autres organes, dépend essentiellement **(1)** de la capacité du protocole d'administration du vecteur AAVr à distribuer celui-ci dans toute la rétine, pour le mettre en contact avec toutes les cellules à traiter, **(2)** de la capacité du vecteur AAVr à entrer dans la cellule et à transporter le transgène dans le noyau, et **(3)** de la capacité du transgène à être exprimé de façon forte et stable par les cellules transduites. Au cours de cette thèse, nous avons essayé d'optimiser le transfert de gène dans la rétine en travaillant sur ces deux premiers points, et nous avons étudié la stabilité de l'expression du transgène dans la rétine.

D'une part, nous avons montré que l'administration intraveineuse du vecteur double brin AAVr (scAAV) de sérotype 9 (scAAV2/9) permet la transduction des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dans une très grande partie de la rétine et dans les deux yeux simultanément, lorsque celui-ci est injecté chez le rat et le chien nouveau-né, mais pas lorsque celui-ci est injecté chez l'animal adulte. En outre, nous avons montré que l'administration intraveineuse du vecteur scAAV2/9 chez le nouveau-né permet la mise en place d'une tolérisation immunologique vis-à-vis du transgène, lorsque ce vecteur est injecté chez l'animal nouveau-né, mais pas lorsqu'il est injecté chez l'animal adulte.

D'autre part, nous évalué l'impact de l'exposition prolongée à la lumière environnementale sur la stabilité de l'expression de différents vecteurs simple brin AAV4 et AAV5 dans la rétine, chez le rat adulte, par rapport à des conditions de lumière environnementale cyclique et de pénombre classiquement trouvées en animalerie. Nous avons montré que l'exposition prolongée à la lumière induit la perte de l'expression des transgènes évalués dans les photorécepteurs, lorsque les transgènes sont sous le contrôle du promoteur CMV. À l'inverse, nous avons montré que l'exposition prolongée à la lumière n'a pas d'effet sur l'expression dans les photorécepteurs de ces transgènes, lorsque ceux-ci sont dirigés soit le promoteur rhodopsine ou le promoteur rhodopsine kinase. Nous avons aussi montré que l'effet inhibiteur de la lumière sur l'expression des transgènes sous le contrôle du promoteur CMV, passe par l'activation de la cascade de phototransduction dans les photorécepteurs. À l'inverse, nous avons montré que l'expression de transgènes dirigée par le promoteur CMV dans les cellules de l'EPR n'est pas affectée par les conditions de lumière.

MOTS CLEFS :

Œil, rétine, rat, chien, chat, rhesus macaque, vecteur viral, virus adéno-associé, AAV, thérapie génique, transgène, érythropoïétine, transfert de gène *in vivo*, green fluorescence protein.