



# Sommaire

---

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
A. THERAPIE GENIQUE ET VECTEURS VIRAUX.....	1
1. <i>Définition</i> .....	1
2. <i>Utilisation de vecteurs</i> .....	1
3. <i>Stratégies pour le traitement de maladies monogéniques par thérapie génique</i> .....	3
B. ADENO-ASSOCIATED VIRUS ET VECTEURS DERIVES .....	6
1. <i>Génomomes de l'AAV sauvage et recombinant</i> .....	6
a) AAV sauvage.....	6
b) AAV recombinant .....	8
2. <i>Sérotypes naturels et nouveaux variants synthétiques</i> .....	9
3. <i>Trafic intracellulaire</i> .....	12
4. <i>Mécanismes de réplication et vecteur double brin (scAAV)</i> .....	14
5. <i>Méthodes de production des AAV recombinants</i> .....	18
C. AAV RECOMBINANT ET REPONSE IMMUNE .....	19
1. <i>Immunité innée</i> .....	20
2. <i>Immunité adaptative</i> .....	24
a) Capture des antigènes et présentation aux lymphocytes .....	25
b) Réponse humorale médiée par les LB.....	28
(1) Réponse humorale dirigée contre la capsid de l'AAV .....	30
(2) Réponse humorale dirigée contre le produit du transgène.....	33
c) Réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T.....	35
(1) Généralités sur la réponse cellulaire .....	35
(2) Réponse cellulaire dirigée contre la capsid de l'AAVr .....	37
(3) Réponse cellulaire dirigée contre le produit du transgène .....	44
3. <i>Modulation de la réponse immune à l'aide de traitements immunosuppresseurs</i> .....	48
D. TRANSFERT DE GENE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE A L'AIDE D'AAV RECOMBINANT .....	51
1. <i>Transfert de gène par voie intramusculaire</i> .....	52
2. <i>Limites liées à la réponse immune</i> .....	53
3. <i>Limites liées à la voie intramusculaire en clinique</i> .....	54
4. <i>Voies alternatives à la voie intramusculaire</i> .....	57
<b>II. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>63</b>
A. CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	63
B. CHOIX EXPERIMENTAUX .....	65
1. <i>Modèles animaux</i> .....	65
2. <i>Choix du vecteur et dose injectée</i> .....	66

3.	<i>Choix du promoteur et du transgène</i> .....	67
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>69</b>
A.	ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DU VECTEUR DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES APRES INJECTION IM D'UN AAV8R DANS UN MODELE MURIN. ....	69
1.	<i>Contexte de l'étude</i> .....	69
2.	<i>Early interaction of AAV8 vector with the host immune system following intramuscular delivery results in weak but detectable lymphocyte and dendritic cell transduction</i> .....	71
B.	IMPACT DE LA VOIE LR SUR LA BIODISTRIBUTION DU VECTEUR ET SUR L'INITIATION D'UNE REPONSE IMMUNE. ...	97
1.	<i>Contexte de l'étude</i> .....	97
2.	<i>Matériel et méthode</i> .....	98
a)	Production de vecteurs .....	98
b)	Animaux et administration du vecteur.....	98
c)	Extraction d'ADN et PCR quantitative .....	99
d)	Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative .....	100
e)	Isolement de PBMC et de splénocytes .....	100
f)	Expression de la GFP dans le muscle, marquage hématoxyline-éosine-safran (HES) et caractérisation des infiltrats musculaires.....	101
g)	Réponse humorale dirigée contre la protéine GFP et la capsid de l'AAV8 dans le sérum de primate.....	102
h)	Réponse cellulaire dirigée contre la protéine GFP et la capsid de l'AAV8.....	104
i)	Détection de cytokines dans le plasma .....	105
j)	Analyses de 84 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire dans les muscles et ganglions lymphatiques.....	105
k)	Analyses phénotypiques des PBMC .....	106
3.	<i>Résultats</i> .....	106
a)	Expression de la GFP à long terme dans les muscles du membre injecté après administration du vecteur par voie LR.....	107
b)	Détection d'une réponse immune humorale et cellulaire spécifique bien que l'expression du transgène soit maintenue .....	111
c)	Caractérisation de la réponse cellulaire spécifique du transgène.....	116
d)	Détection d'infiltrats musculaires après injection par voie LR .....	121
e)	Drainage du vecteur dans les ganglions lymphatiques .....	127
f)	Analyse des signaux inflammatoires dans le ganglion lymphatique et le membre injecté .....	129
C.	ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DU VECTEUR AAV DANS LES CELLULES DE L'IMMUNITE APRES TRANSFERT DE GENE DANS UN MODELE DE PRIMATE .....	135
1.	<i>Contexte de l'étude</i> .....	135
2.	<i>Matériel et méthode</i> .....	136
a)	Animaux et vecteurs injectés .....	136
b)	Isolement de PBMC à partir de sang total isolation .....	136
c)	Isolement de cellules à partir de rate et de ganglion lymphatique.....	136

d)	Tris cellulaires à partir de PBMC, splénocytes et cellules isolées à partir de ganglions lymphatiques 137	
e)	Phénotypage des PBMC et splénocytes .....	137
f)	Détection de génome viral .....	138
g)	Analyse des formes moléculaires de l'AAV .....	138
2.	<i>Résultats</i> .....	139
a)	Animaux et prélèvements .....	139
b)	Détection de génome viral dans les PBMC et cellules isolées à partir de rate et de ganglion lymphatique de primates .....	139
c)	Détection de génome viral dans les DC, LT et LB isolés à partir de PBMC et de rate .....	141
d)	Expression de la protéine GFP dans les PBMC et fractions cellulaires isolées à partir de rate ....	143
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>153</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>167</b>
<b>VI.</b>	<b>ANNEXES</b> .....	<b>173</b>
A.	ARTICLE..... <i>Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates : implications for gene doping</i> .....	173
B.	COMMUNICATION AFFICHEE..... <i>Intramuscular AAV8 delivery in mice results in intricate vector interactions with the host immune system and dendritic cell transduction</i> .....	185
C.	COMMUNICATION AFFICHÉE..... <i>Macaque immune responses following AAV-based gene transfer to the skeletal muscle : addressing the method of vector delivery</i> .....	187
D.	COMMUNICATION AFFICHÉE .....	189
	<i>Locoregional intravenous delivery of AAV vector in macaque results in persistent transgene expression despite a dedicated humoral and cellular immune response</i> .....	189
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>191</b>



# Illustrations

---

## FIGURES :

<b>Figure 1</b> : Utilisation de vecteurs viraux dans les essais cliniques de thérapie génique <sup>3</sup> .....	2
<b>Figure 2</b> : Stratégie de saut d'exon développée au laboratoire dans un modèle spontané de chien GRMD atteint de la myopathie de Duchenne.....	5
<b>Figure 3</b> : Structure secondaire de l'ITR de l'AAV2 .....	7
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique du génome de l'AAV sauvage .....	8
<b>Figure 5</b> : Schéma du génome de l'AAV recombinant dérivé de l'AAV2 sauvage. ....	9
<b>Figure 6</b> : Analyses phylogénétiques des sérotypes et variants de l'AAV basées sur la séquence VP1 .....	10
<b>Figure 7</b> : Modélisation de l'entrée et du trafic intracellulaire de l'AAV .....	14
<b>Figure 8</b> : Cycle de réplication de l'AAV et formation des génomes dimériques pour la production de scAAV ...	17
<b>Figure 9</b> : Voies de signalisation induites par les TLR.....	21
<b>Figure 10</b> : Activation de la réponse immune innée après transfert de gène à l'aide d'AAVr .....	23
<b>Figure 11</b> : Chargement de peptides à la surface du CMH de classe I .....	26
<b>Figure 12</b> : Chargement de peptide à la surface du CMH de classe II.....	27
<b>Figure 13</b> : Signaux nécessaires à l'activation d'un lymphocyte .....	28
<b>Figure 14</b> : Différenciation des LT CD4 en lymphocytes T-helper. ....	36
<b>Figure 15</b> : Dosage des transaminases sériques et fréquence des LT CD8 spécifiques de l'AAV2 après transfert de gène à l'aide d'AAV recombinant .....	38
<b>Figure 16</b> : Modélisation des mécanismes responsables de la destruction des hépatocytes transduits par le système immunitaire .....	39
<b>Figure 17</b> : Représentation du niveau en triglycérides et créatine kinase avant et après injection chez un patient traité par voie intramusculaire avec un AAV1-LPL .....	40
<b>Figure 18</b> : Proportion de LT CD4 et CD8 répondant à la capsid de l'AAV2 chez l'Homme et AAV8 chez le primate .....	42
<b>Figure 19</b> : Expression à long terme de l' $\alpha_1$ -anti-trypsin humaine (hAAT) dans le muscle squelettique de souris injectées avec un AAV2 par voie intramusculaire .....	52
<b>Figure 20</b> : Concentration en facteur IX (FIX) canin dans le plasma de souris NOD/SCID après injection intramusculaire de sérotypes 1, 2, 3, 4 ou 5 d'AAV recombinants .....	55
<b>Figure 21</b> : Marquage X-gal de muscles de chien injecté avec un AAV-LacZ par voie locorégionale .....	59
<b>Figure 22</b> : Vecteur AAV utilisé dans l'étude de Toromanoff <i>et al</i> , 2010.....	60
<b>Figure 23</b> : Mesure de l'Erythropoïétine dans le sérum de primates après injection par voie locorégionale d'un vecteur AAV1-rtTA/Epos.....	61

<b>Figure 24</b> : Expression de la protéine GFP dans les muscles des primates injectés avec un vecteur scAAV8 GFP .....	109
<b>Figure 25</b> : Analyse cinétique de la sécrétion d'IFN $\gamma$ par les PBMC circulants en réponse aux peptides dérivés de l'AAV8 des primates injectés avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7) .....	113
<b>Figure 26</b> : Réponse immunitaire adaptative dirigée contre la protéine GFP après injection du vecteur par voie LR ou IM .....	115
<b>Figure 27</b> : Analyse cinétique de la sécrétion d'IFN $\gamma$ par les PBMC circulants en réponse aux peptides dérivés de la GFP des primates injectés avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7).....	116
<b>Figure 28</b> : Sécrétion d'IL2 mesurée par un test ELISpot après la restimulation de splénocytes <i>in vitro</i> .....	118
<b>Figure 29</b> : Sécrétion d'IL10 mesurée par un test ELISpot après la restimulation de PBMC <i>in vitro</i> .....	120
<b>Figure 30</b> : Pourcentage de LB, cellules NK, LT et Treg dans la circulation au cours du temps. ....	122
<b>Figure 31</b> : Détection d'infiltrats musculaires dans le membre injecté des primates injectés par voie LR ou IM. ....	124
<b>Figure 32</b> : Caractérisation des infiltrats musculaires détectés chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR ou IM.....	125
<b>Figure 33</b> : Immunomarquage Foxp3 sur les biopsies musculaires de primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR ou IM.....	126
<b>Figure 34</b> : Détection de génome viral et de transcrite dans les ganglions lymphatiques à 7 jours post-injection .....	128
<b>Figure 35</b> : Quantification de la concentration en cytokines circulantes.....	130
<b>Figure 36</b> : Expression de gènes codant pour des chimiokines et cytokines et leurs récepteurs et impliqués dans la réponse inflammatoire .....	132
<b>Figure 37</b> : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP, en fonction du temps, dans les PBMC circulants. ....	145
<b>Figure 38</b> : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP dans les splénocytes à J60 post-injection .....	146
<b>Figure 39</b> : Analyse de la prolifération des PBMC de primates à J30 post-injection dans les populations présentant et ne présentant pas de signal GFP .....	148
<b>Figure 40</b> : Caractérisation des cellules en prolifération présentant du signal GFP .....	149
<b>Figure 41</b> : Analyse des formes moléculaires du génome de l'AAV dans les PBMC et les splénocytes de primates. ....	150
<b>Figure 42</b> : Immunologie du transfert de gène dans le muscle squelettique. ....	171

**TABLEAUX :**

<b>Tableau 1</b> : Caractéristiques des différents vecteurs viraux utilisés en thérapie génique. ....	3
<b>Tableau 2</b> : Tableau récapitulatif des sérotypes d'AAVr utilisés en transfert de gène et décrits comme optimaux pour un tissu donné.....	12
<b>Tableau 3</b> : Récapitulatif des récepteurs et corécepteurs identifiés pour les différents sérotypes de l'AAV .....	13

<b>Tableau 4</b> : Tableau récapitulatif des doses de vecteurs injectés, de la voie d'administration et du promoteur utilisés dans l'étude .....	107
<b>Tableau 5</b> : Tableau récapitulatif du nombre de copies de vecteur et de transcrit de génome viral détectés dans les tissus des primates injectés.....	110
<b>Tableau 6</b> : Détection d'anticorps et de facteurs neutralisants dirigés contre la capsid de l'AAV8 .....	112
<b>Tableau 7</b> : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IFN $\gamma$ de splénocytes totaux ou déplétés après restimulation.....	114
<b>Tableau 8</b> : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IL-2 par les splénocytes totaux ou déplétés après restimulation.....	117
<b>Tableau 9</b> : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IL-10 de PBMC après restimulation .....	119
<b>Tableau 10</b> : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans les cellules immunitaires de primates.....	140
<b>Tableau 11</b> : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans les LT CD4 et LT CD8 et les LB isolés à partir de PBMC.....	142
<b>Tableau 12</b> : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes isolées à partir de splénocytes.....	143
<b>Tableau 13</b> : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP dans les différentes populations cellulaires des PBMC circulants à J30 post-injection.....	146



## Abréviations

---

<b>AAT</b>	alpha1-antitrypsine
<b>AAV</b>	adeno-associated virus
<b>AAVr</b>	adeno-associated virus recombinant
<b>Ad</b>	Adénovirus
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNg</b>	acide désoxyribonucléique génomique
<b>AFM</b>	association française contre les myopathies
<b>AON</b>	oligonucléotide anti-sens
<b>APC</b>	cellule présentatrice d'antigène
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>ATG</b>	anti-thymocyte globulin
<b>BCR</b>	B-cell receptor
<b>CAV</b>	cavéoline
<b>CCP</b>	voie dépendante de la clathrine
<b>CD40L</b>	CD40 Ligand
<b>cDC</b>	cellule dendritique conventionnelle
<b>CFTR</b>	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
<b>CLIC/GEEC</b>	voie indépendante de la clathrine
<b>c-Met</b>	hepatocyte growth receptor
<b>CMH I</b>	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
<b>CMH II</b>	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<b>CMV</b>	cytomégalovirus
<b>Ct</b>	cycle threshold
<b>CTL</b>	lymphocyte T cytotoxique
<b>DC</b>	cellule dendritique
<b>Des</b>	desmine
<b>DO</b>	densité optique
<b>DMD</b>	dystrophie musculaire de Duchenne
<b>EE</b>	endosome précoce
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ELISpot</b>	enzyme-linked immunosorbent spot
<b>Epo</b>	erythropoïétine
<b>FGFR I</b>	fibroblast growth factor de type 1
<b>FIX</b>	facteur IX
<b>Foxp3</b>	forkhead box P3
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>GRMD</b>	golden retriever muscular dystrophy
<b>HES</b>	hématoxyline-éosine-safran
<b>Hg</b>	mercure

<b>HPRT</b>	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
<b>HSV</b>	herpes simplex virus
<b>IFN</b>	interféron
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IgG</b>	Immunoglobuline de type G
<b>IgM</b>	Immunoglobuline de type M
<b>IL</b>	interleukine
<b>IM</b>	intramusculaire
<b>iono</b>	ionomycine
<b>IRF</b>	interferon regulatory factor
<b>ITR</b>	inverted-terminal repeat
<b>iTreg</b>	Treg induits
<b>IU/L</b>	unité internationale par litre
<b>IV</b>	intraveineuse
<b>kb</b>	kilobase
<b>KO</b>	knock-out
<b>LB</b>	lymphocyte B
<b>LE</b>	endosome tardif
<b>LPL</b>	lipoprotéine lipase
<b>LR</b>	voie intraveineuse loco-régionale
<b>LT</b>	lymphocyte T
<b>LT Th1</b>	lymphocyte T-helper 1
<b>LT Th2</b>	lymphocyte T-helper 2
<b>MCK</b>	muscle creatine kinase
<b>MCP1</b>	monocyte chemoattractant protein-1
<b>mDC</b>	cellule dendritique myéloïde
<b>MIP2</b>	macrophage inflammatory protein-2
<b>miRNA</b>	microARN
<b>MMF</b>	mycophénolate mofétil
<b>mmol/L</b>	millimole par litre
<b>MOI</b>	multiplicity of infection
<b>MP</b>	macropinocytose
<b>mU/mL</b>	milliunité par millilitre
<b>MyD88</b>	myeloid differenciation primary response protein
<b>NA</b>	non applicable
<b>nd</b>	non détecté
<b>NFkB</b>	nuclear factor kB
<b>ng</b>	nanogramme
<b>NK</b>	natural killer
<b>NPC</b>	pore nucléaire
<b>nTreg</b>	lymphocyte T régulateur naturel
<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>pb</b>	paire de bases
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cell

<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PD1</b>	programmed cell death 1
<b>pDC</b>	cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PDGFR</b>	platelet-derived growth factor receptor
<b>PD-L1</b>	programmed cell death ligand 1
<b>PGK</b>	phosphoglycérate kinase
<b>PMA</b>	phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PNRE</b>	endosome de recyclage
<b>PRR</b>	pattern Recognition Receptor
<b>PS-Dnase</b>	plasmid-safe DNase
<b>qPCR</b>	polymerase chain reaction quantitative
<b>RBE</b>	Rep binding element
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>RL</b>	récepteur à la laminine
<b>RQ</b>	quantité relative
<b>RT</b>	reverse transcription
<b>RT-PCR</b>	reverse-transcription PCR
<b>rtTA</b>	reverse tetracycline transactivator
<b>scAAV</b>	AAV self-complementary
<b>SFC</b>	spot forming colony
<b>siRNA</b>	ARN interférence
<b>SMA</b>	amyotrophie spinale
<b>ssAAV</b>	single-stranded AAV
<b>TAP</b>	transporter associated with antigen processing
<b>TCM</b>	lymphocyte T de la mémoire centrale
<b>TCR</b>	recepteur des lymphocytes T
<b>TEFF</b>	lymphocyte T effecteur
<b>TEM</b>	lymphocyte T effecteur mémoire
<b>TIR</b>	Toll/IL-1R homology
<b>TLR</b>	toll-like receptor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor alpha
<b>Treg</b>	lymphocyte T régulateur
<b>TRIF</b>	TIR domain containing adapter inducing interferon $\beta$
<b>trs</b>	terminal resolution site
<b>vg</b>	génomme viral
<b>vg/dg</b>	génomme viral/génomme diploïde
<b>VIH</b>	virus de l'immunodéficiencie humaine
<b>ZFN</b>	zinc-finger nuclease



## Avant-propos

---

Les vecteurs dérivés d'*adeno-associated* virus (AAVr) apparaissent aujourd'hui comme des vecteurs de choix pour le traitement de maladies monogéniques par thérapie génique. En effet, ces vecteurs sont capables de transduire efficacement de nombreux tissus comme le foie (Nathwani et al. 2007), le muscle (Favre et al. 2002 ; Toromanoff et al. 2008), la rétine (Acland et al. 2005) ou encore le système nerveux central (Bosh et al. 2000). Une seule administration d'un AAVr est capable d'induire une expression à long terme du transgène d'intérêt sans pour autant que cela passe par un phénomène d'intégration dans le génome. En effet, dans le cas d'un transfert de gène, le génome de l'AAVr persiste majoritairement sous forme épisomale (Miao et al. 1998, Nowrousi et al. 2012), réduisant ainsi le risque de mutagenèse insertionnelle.

Par ailleurs, les AAVr ont longtemps été décrits comme faiblement immunogènes. Pourtant, la translation des études depuis les modèles de rongeurs vers les modèles de gros animaux et plus récemment le développement d'essais cliniques chez l'Homme a montré que ces vecteurs pouvaient induire une réponse immune, qu'elle soit dirigée contre la capsidie et/ou le produit du transgène. Ces réponses aboutissent même dans certains cas à la perte d'expression de la protéine d'intérêt (Favre et al. 2002, Manno et al. 2006).

Concernant la réponse immune à l'encontre du produit du transgène, la voie d'administration et/ou le tissu-cible semblent être des facteurs déterminants. En effet, concernant le muscle squelettique, le transfert de gène à l'aide d'une injection intramusculaire (IM) d'AAVr est souvent associé à une réponse immune dirigée contre le produit du transgène dans des modèles de gros animaux (Herzog et al. 2001, Favre et al. 2002, Ross et al. 2006). A l'inverse, l'administration d'AAVr par voie intraveineuse locorégionale (LR), consistant à perfuser le vecteur sous pression dans un membre isolé à l'aide d'un garrot, semble être moins immunogène vis-à-vis du transgène chez le primate (Toromanoff et al. 2010) et le chien (Haurigot et al. 2010).

Cette thèse a eu pour objectif d'étayer ces observations chez le primate en utilisant un AAVr exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) dont l'immunogénicité est reconnue chez le macaque. Contrairement à la voie IM où l'expression de la GFP a été transitoire, la voie LR a résulté en une expression de la protéine à long terme, confirmant ainsi les résultats

des études précédentes. De façon surprenante, le maintien de l'expression du transgène a été observé malgré la survenue de réponses immunes humorale et cellulaire spécifiques du produit du transgène. Mes travaux ont plus particulièrement visé à comprendre pourquoi la voie LR n'a pas induit le rejet du transgène. Pour cela, les réponses immunes humorale et cellulaire ont été caractérisées, ainsi que les interactions entre l'AAVr et les organes lymphoïdes. Une attention particulière a été portée à l'étude des signaux inflammatoires induits *in situ*, dans le muscle et les organes lymphoïdes drainants. Enfin, l'impact du promoteur et de l'expression du transgène dans le système immunitaire, sur l'immunogénicité de la voie LR, ont été étudiés. Pour cela, le promoteur ubiquitaire CMV a été comparé au promoteur desmine (Des) spécifique du muscle.

Ces travaux ont permis d'apporter des éléments de réponse quant à la faible immunogénicité de la voie LR et soulignent l'importance de l'utilisation de promoteurs spécifiques de tissus au détriment de promoteurs ubiquitaires dans le cadre de protocoles de transfert de gène.

# I. Introduction

## A. *Thérapie génique et vecteurs viraux*

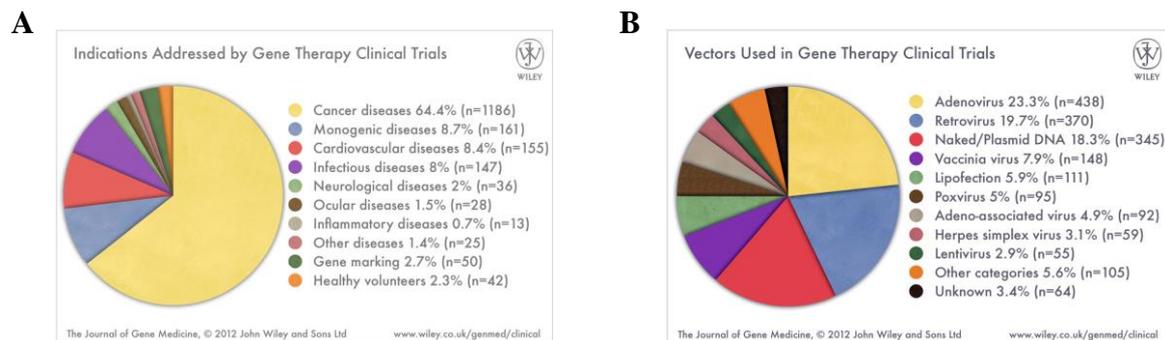
### 1. Définition

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique qui consiste à introduire, dans une cellule, un gène d'intérêt thérapeutique dans le but de soigner ou de ralentir la progression d'une maladie héréditaire ou acquise. Pour que le transfert de matériel génétique soit efficace, il apparaît nécessaire d'avoir un véhicule pour délivrer le gène thérapeutique que ce soit dans des cellules, des tissus ou des organes entiers. Ces véhicules sont appelés vecteurs, ils peuvent être d'origine virale ou non-virale.

### 2. Utilisation de vecteurs

Les vecteurs non-viraux sont des vecteurs dits physiques ou chimiques. La stratégie utilisant les vecteurs physiques consiste à altérer de manière transitoire la membrane cellulaire afin de transférer de l'ADN à l'intérieur des cellules. Pour permettre cette altération provisoire, des méthodes d'électroporation, d'électrotransfert (Miyazaki et Aihara 2002) ou encore de bombardement de particules (aussi appelé *gene gun*) (R. M. Klein et al. 1992) (Yang et al. 1990) sont utilisées. Ces techniques aboutissent, certes, à une augmentation de l'expression du transgène d'intérêt mais sont souvent associées à des lésions au site d'injection liées notamment au choc électrique induit pour faire entrer l'ADN dans les cellules (Hartikka et al. 2001). Les vecteurs chimiques quant à eux regroupent les polymères cationiques et les liposomes qui entourent l'ADN d'intérêt et facilitent l'entrée dans la cellule (Balazs et Godbey 2011). Alors que les vecteurs non-viraux peuvent être produits en large quantité et possède une capacité d'encapsulation importante, ils sont actuellement inefficaces pour la thérapie génique. En effet, ils aboutissent dans la plupart des cas à une expression transitoire du transgène (Coutelle et Williamson 1996 ; Romano 2007).

C'est pourquoi, les vecteurs dérivés de virus dits vecteurs viraux apparaissent aujourd'hui comme des vecteurs de choix pour le traitement par thérapie génique des maladies telles que le cancer (Cawood et al. 2012) ou les maladies cardiovasculaires (Kratlian et Hajjar 2012) mais aussi les maladies monogéniques (Flotte 2007) (**Figure 1**). Pour cette dernière application, certains vecteurs viraux ont la propriété de maintenir l'expression d'un transgène à long terme chez un individu soit sous forme intégrée (Bushman 2007) soit sous forme épisomale (Nowrouzi et al. 2012).



**Figure 1 : Utilisation de vecteurs viraux dans les essais cliniques de thérapie génique. A)** Maladies concernées par le traitement par thérapie génique. Les maladies monogéniques arrivent en deuxième position après le traitement des cancers. **B)** Types de vecteurs utilisés dans le monde pour traiter ces maladies. Les vecteurs viraux sont utilisés de manière majoritaire devant les vecteurs non-viraux. *Extrait de Ginn et al. 2013*

Les vecteurs viraux sont dérivés de virus sauvages et sont aujourd'hui utilisés dans 70% des essais cliniques chez l'Homme. Les plus utilisés pour le traitement de maladies génétiques héréditaires sont les rétrovirus, les *adeno-associated* virus (AAV) et les lentivirus. Les vecteurs dérivés des adénovirus (Ad) sont quant à eux plus souvent utilisés pour le traitement des cancers. Chaque vecteur présente ses avantages et ses inconvénients et va être plus ou moins adapté au traitement d'une pathologie donnée (**Tableau 1**).

Le laboratoire INSERM UMR1089 où j'ai effectué ma thèse utilise plus particulièrement les vecteurs dérivés de l'AAV pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à traiter les maladies monogéniques de la rétine et neuromusculaires. Ce vecteur présente l'avantage de pouvoir être produit en grande quantité, d'infecter aussi bien des cellules en division que des cellules quiescentes et de ne pas ou peu s'intégrer dans le génome de cellule-hôte, réduisant ainsi le risque de mutagenèse insertionnelle. Il possède

cependant une capacité d'encapsidation réduite par rapport aux autres vecteurs cités. Ce point peut paraître critique pour le traitement de certaines pathologies où il faut apporter une copie intègre et complète du gène. Des stratégies de trans-épissage entre deux génomes viraux ont d'ailleurs été menées *in vitro* et *in vivo* pour optimiser ce paramètre (Yan et al. 2000 ; Nakai, Storm, et Kay 2000a).

Vecteur viral	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	Adeno-associated virus
<b>Génome</b>	ARN	ARN	ADN double brin	ADN simple brin
<b>Capacité d'encapsidation</b>	8 kb	8 kb	7 à 35 kb	4,7 kb
<b>Infection de cellules quiescentes</b>	non	oui	oui	oui
<b>Intégration dans le génome</b>	oui	oui	non	rare
<b>Durée d'expression</b>	long terme	long terme	court terme	long terme
<b>Immunogénicité</b>	Faible	Faible	Importante	Faible
<b>Application principale</b>	Cancer, maladies monogéniques	Cancer, maladies monogéniques	Cancer	Maladies monogéniques
<b>Nombre d'essais cliniques recensés dans le monde en 2012</b>	375	62	437	99

**Tableau 1: Caractéristiques des différents vecteurs viraux utilisés en thérapie génique.**

Le fait de transduire de nombreux types cellulaires va permettre à l'AAV de cibler différents tissus tels que le muscle, le foie, l'œil ou encore le cerveau. Ce vecteur apparaît alors comme un outil de choix pour le transfert de gène car il peut cibler un large panel de pathologies.

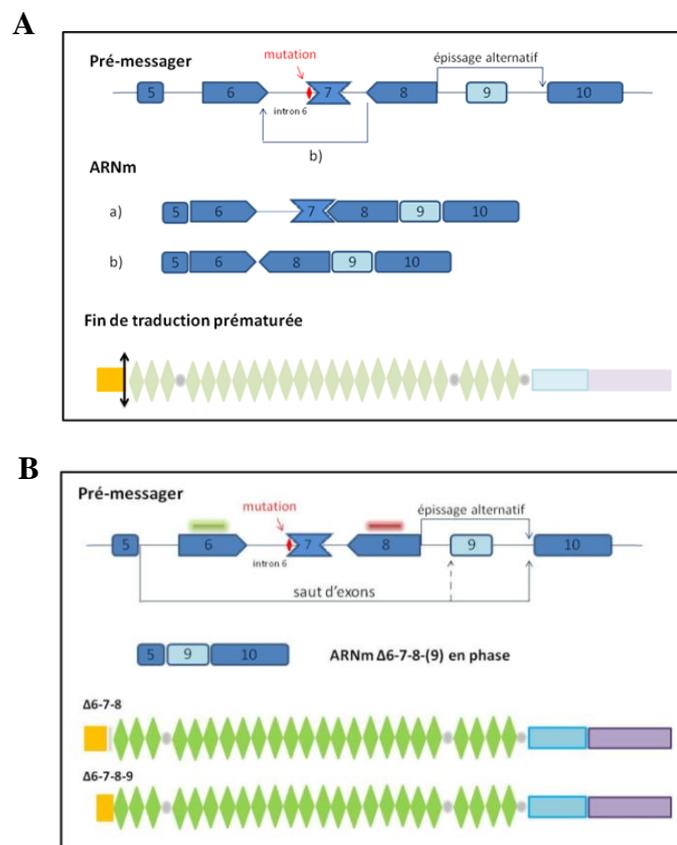
### **3. Stratégies pour le traitement de maladies monogéniques par thérapie génique**

Pour le traitement de maladies monogéniques, plusieurs stratégies s'articulent autour de la thérapie génique. Tout d'abord, la thérapie génique peut permettre de remplacer la

fonction d'un gène défectueux par l'apport d'une copie fonctionnelle du gène. C'est la stratégie la plus largement utilisée aujourd'hui et qui a maintenant fait ses preuves dans des essais cliniques, chez des patients atteints d'immunodéficience sévère combinée liée à l'X (Hacein-Bey-Abina et al. 2010), d'hémophilie B (Nathwani, Rosales, et al. 2011), d'adrénoleucodystrophie (Cartier et al. 2009), de déficit en lipoprotéine lipase (LPL) (Stroes et al. 2009) ou encore d'Amaurose congénitale de Leber (Simonelli et al. 2010).

La thérapie génique peut également permettre de corriger l'ARN messager (ARNm) défectueux. Parmi les techniques de correction d'ARNm, la stratégie du saut d'exon apparaît aujourd'hui comme prometteuse notamment pour le traitement de la myopathie de Duchenne (DMD) causée par un défaut du gène codant pour la dystrophine. Le principe du saut d'exon est de rétablir un cadre de lecture correct donnant ainsi lieu à une protéine fonctionnelle. Cette stratégie consiste à apporter directement ou à l'aide d'un vecteur viral des acides ribonucléiques (ARN) ou des oligonucléotides anti-sens (AON) qui ciblent des sites d'épissage anormaux entraînant la production d'une protéine défectueuse. Le fait de bloquer ces sites d'épissage va forcer la machinerie cellulaire à sélectionner d'autres sites d'épissage corrects (Gorman et al. 1998). Cette stratégie a pour but de faire produire une protéine plus courte mais fonctionnelle. Cela a notamment été décrit *in vivo* chez des souris mdx (modèle de souris dystrophiques) qui après une administration unique d'un vecteur viral, codant pour un ARN anti-sens (U7snRNA), ont présenté un maintien de l'expression de la protéine dystrophine ainsi qu'une correction du phénotype dystrophique (Goyenvalle et al. 2004). Cette technologie a d'ailleurs été transposée au laboratoire, dans le cadre d'un essai multicentrique regroupant l'expertise des centres Genethon, Institut de Myologie et Atlantic Gene Therapies (**Figure 2**). Cet essai pré-clinique a consisté à injecter un vecteur AAV codant pour cet U7snRNA dans un modèle de chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), modèle canin de la DMD, et a montré la restauration de l'expression de la dystrophine à hauteur de 60-80% dans le membre injecté. Ce protocole est actuellement en phase de transfert pour débiter un essai de phase I/II d'ici 2015. Par ailleurs, un essai clinique de phase I est actuellement en cours pour l'utilisation d'AON, cette fois, chez des patients atteints d'amyotrophie spinale (SMA) (C.F. Bennett, communication ASGCT 2013) après une preuve de concept chez la souris et le primate (Passini et al. 2011). Une demande de brevet a d'ailleurs récemment été déposée pour ce produit.

Une autre stratégie expérimentale vise à réduire le niveau d'expression d'une protéine à l'aide d'ARN interférence (siRNA). Ces petits ARN double brin ont été identifiés en 1998 chez *C. Elegans* (Fire et al. 1998) et ont pour fonction de dégrader des ARNm dans des cellules eucaryotes. Ce système permet de cibler de manière spécifique un gène donné. La preuve de concept a notamment été faite chez le rongeur dans des modèles de maladie neurodégénérative (Xia et al. 2004) mais également chez le primate pour le traitement de maladies coronariennes (Zimmermann et al. 2006).



**Figure 2 : Stratégie de saut d'exon développée au laboratoire dans un modèle spontané de chien GRMD atteint de la myopathie de Duchenne. A)** Une mutation dans le gène codant pour la dystrophine, au niveau du site accepteur de l'épissage de l'exon 6, est responsable d'un décalage dans le cadre de lecture. Cela entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré qui aboutit à la production d'une protéine non fonctionnelle. **B)** Le saut d'exon à l'aide des oligonucléotides anti-sens ciblant les exons 6 et 8 va permettre de restaurer un cadre de lecture correct. Une protéine plus courte mais fonctionnelle va être produite. *Extrait du rapport de M2 de Claire Domenger.*

Enfin, une autre stratégie de thérapie génique consiste à modifier le génome humain de manière ciblée. L'approche de correction génique la plus développée à ce jour repose sur

l'utilisation de *zinc-finger* nucléases (ZFN). Ce sont des enzymes de restriction synthétiques qui contiennent des motifs de liaison à l'ADN en doigt de zinc liés à un domaine à activité « nucléase » de l'enzyme de restriction FokI. Chaque domaine de liaison à l'ADN reconnaît 3 paires de bases (pb) dans l'ADN. Ces ZFN créent des cassures de l'ADN double brin qui peuvent être réparées soit par des mécanismes de recombinaison non-homologue, qui résultera en la perte de l'information génétique, soit par des mécanismes de recombinaison homologue utilisant une séquence d'ADN pour réparer ou modifier un locus donné. Cette dernière apparaît comme prometteuse pour la correction de mutation génétique à la fois *in vitro* et plus récemment *in vivo* dans un modèle de souris humanisées présentant une mutation dans l'intron 1 du gène codant pour le facteur IX (FIX) humain (Hojun Li et al. 2011).

Au laboratoire INSERM UMR1089, ce sont plus particulièrement les approches de saut d'exons et de thérapie d'addition qui sont utilisées. Les séquences codantes sont amenées à l'aide de vecteurs AAV.

## **B. *Adeno-associated virus* et vecteurs dérivés**

De manière à produire des vecteurs de thérapie génique sûrs, il apparaît nécessaire d'étudier la structure du génome du virus sauvage et de comprendre son cycle cellulaire. C'est d'ailleurs grâce à la caractérisation des séquences requises en *cis* pour permettre l'expression du génome de l'AAV, sa répllication et son encapsidation qu'une méthodologie a pu être établie pour la production des AAVr.

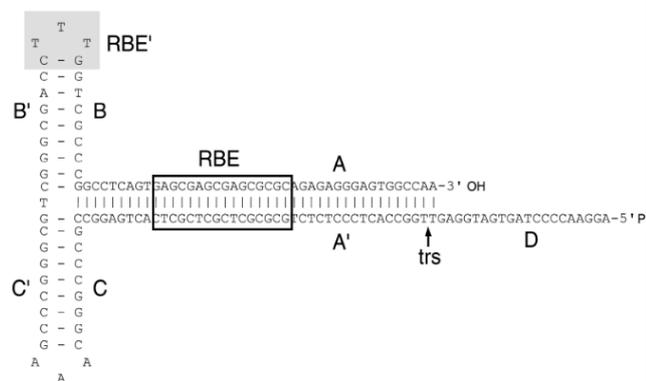
### **1. Génomes de l'AAV sauvage et recombinant**

#### **a) AAV sauvage**

L'AAV sauvage a été décrit pour la première fois en 1965 (Atchison, Casto et Hammon, 1965) comme contaminant d'une préparation adénovirale. C'est un virus à ADN

simple brin, non-enveloppé. Il appartient à la famille des *Parvoviridae* et au genre *Dependoviridae* car il n'est capable de se répliquer qu'en présence d'un virus auxiliaire tel que l'adénovirus (Atchison, Casto et Hammon, 1965), le virus de l'herpès (HSV) (Georg-Fries et al. 1984), le virus de la vaccine (Schlehofer, Ehrbar, et zur Hausen 1986) ou encore le papillomavirus (Ogston, Raj, et Beard 2000). En absence de virus auxiliaire, l'AAV reste sous forme latente et peut notamment s'intégrer dans le chromosome 19q13.4 au niveau du site AAVS1 (Kotin, Linden, et Berns 1992 ; Hojun Li et al. 2011). L'AAV est l'un des virus les plus petits (environ 20nm), sa capsid est icosaédrique et sa structure cristallographique a été décrite (Xie et al. 2002).

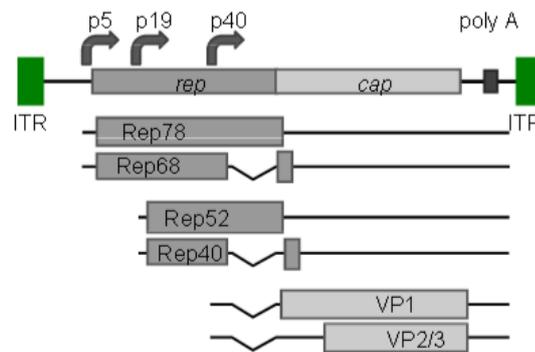
Le génome de l'AAV, de 4,7 kilobases (kb), est composé de deux gènes *rep* et *cap* flanqués par deux séquences ITR (Inverted Terminal Repeat) de 145 pb dont les 125 premières pb sont palindromiques et présentent une structure en épingle à cheveux (Lusby, Fife, et Berns 1980) (**Figure 3**). Le génome de l'AAV peut se présenter sous forme de brin « + » ou « - », encapsidés aussi efficacement l'un que l'autre (Rose et al. 1969).



**Figure 3 : Structure secondaire de l'ITR de l'AAV2.** L'ITR sert d'origine de répllication et est composé de deux bras palindromiques (B-B' et C-C') faisant eux-mêmes partie d'un palindrome plus large (A-A'). Le rectangle correspond à la partie RBE (Rep Binding Element) où viennent se lier les protéines Rep78 et Rep68. L'activité hélicase de ces protéines va entraîner un remodelage de la région A-A' donnant lieu à une boucle jusqu'au niveau du site trs (terminal resolution site). Dans cette conformation, les protéines Rep78 et Rep68 vont provoquer une cassure au niveau du trs. La région RBE' permet de stabiliser l'interaction entre les protéines Rep et l'ITR. *Extrait de Gonçalves 2005*

L'AAV dispose de trois promoteurs pour réguler l'expression de ses gènes : p5, p19 qui régulent le gène *rep* et p40 qui régule le gène *cap*. Les deux gènes *rep* et *cap* possèdent

plusieurs cadres de lecture : *rep* code pour 4 protéines impliquées dans la réplication de l'AAV (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40), *cap* code pour les protéines de la capsid virale (VP1, VP2 et VP3) (**Figure 4**). Les protéines Rep78 et Rep68 jouent un rôle non seulement dans la réplication de l'ADN viral grâce à leurs interactions avec les séquences RBE (Rep-Binding Element) et trs (terminal resolution site) situées dans les ITR (**Figure 3**) mais également dans l'intégration et la régulation de la transcription de l'AAV. Ces deux protéines peuvent avoir à la fois un rôle de répresseur et d'activateur (Pereira, McCarty, et Muzyczka 1997). Les protéines Rep52 et Rep40, quant à elles, possèdent une activité hélicase et ATPase (Collaco et al. 2003) (Smith et Kotin 1998) et jouent un rôle dans la réplication et l'encapsidation lors de l'assemblage du virus.



**Figure 4 : Représentation schématique du génome de l'AAV sauvage.** Le génome de l'AAV est composé de deux gènes *rep* et *cap* flanqués par deux ITR. Il possède trois promoteurs : p5, p19 qui régulent le gène *rep* et p40 qui régule le gène *cap*. *rep* code pour 4 protéines impliquées dans la réplication de l'AAV (Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40), *cap* code pour les protéines de la capsid virale (VP1, VP2 et VP3). *Extrait de de Oliveira et Fraefel 2010*

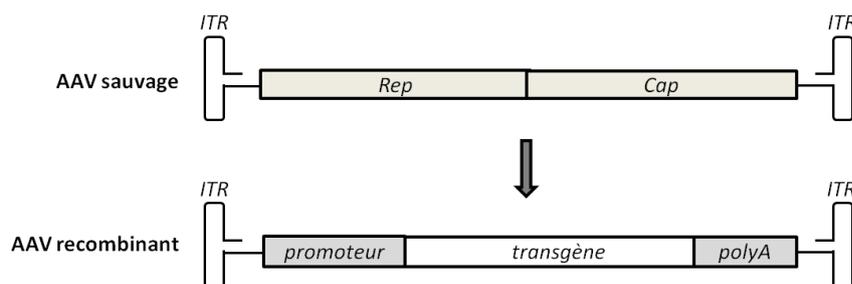
## b) AAV recombinant

Dans un souci de sécurité du transfert de gène, il apparaît primordial d'éliminer les éléments nécessaires au cycle viral afin d'éviter la génération de particules compétentes pour la réplication.

Dans le cadre de la production de vecteurs AAV, les gènes *rep* et *cap* du génome sont remplacés par la cassette d'expression d'intérêt contenant classiquement un promoteur, un

transgène et un signal de polyadénylation (**Figure 5**). Seules les séquences ITR sont conservées car elles contiennent tous les éléments nécessaires en *cis* pour permettre le maintien du génome, sa réplication et son encapsidation. En général, ce sont les ITR de l'AAV2 qui sont utilisés mais l'utilisation d'ITR issus d'autres sérotypes est possible. Ces séquences sont conservées entre les sérotypes et n'entraînent pas de modification dans l'efficacité de transduction aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Dirk Grimm et al. 2006).

Alors qu'il est décrit que l'AAV sauvage reste sous forme latente en s'intégrant dans le génome au niveau du site AAVS1 en l'absence de virus auxiliaire (Kotin, Linden, et Berns 1992 ; Hojun Li et al. 2011), il semblerait qu'utilisé en tant que vecteur, l'AAV perde sa capacité d'intégration, persistant ainsi majoritairement sous forme épisomale. Cette hypothèse a notamment été vérifiée chez la souris (Miao et al. 1998 ; Schnepf et al. 2003) mais également chez le primate (Nowrouzi et al. 2012).

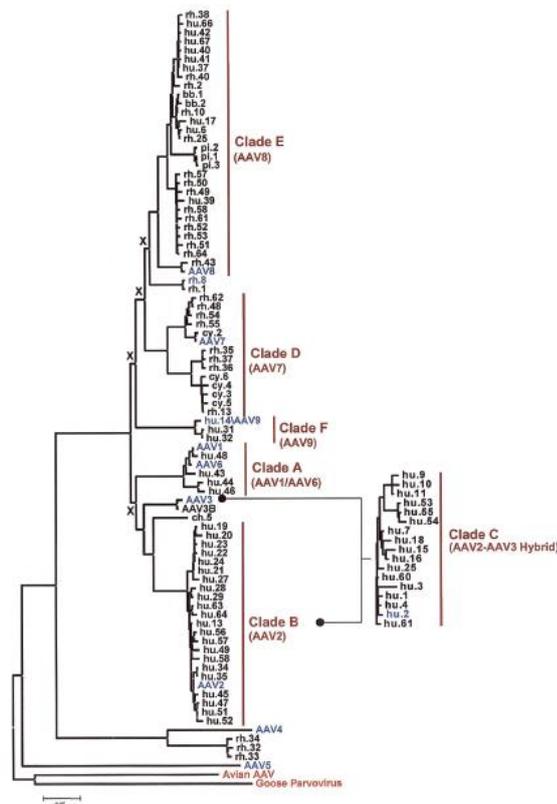


**Figure 5 : Schéma du génome de l'AAV recombinant dérivé de l'AAV2 sauvage.** Schéma du génome d'un AAV recombinant. Les ITR sont les seules séquences virales conservées dans un vecteur AAV. Les gènes *rep* et *cap* ont été remplacés par une cassette d'expression contenant classiquement un promoteur, un gène thérapeutique et un site de polyadénylation.

## 2. Sérotypes naturels et nouveaux variants synthétiques

A ce jour, l'AAV présente douze sérotypes (notés 1 à 12) et plus d'une centaine de variants. Chaque sérotype présente un tropisme préférentiel pour un ou plusieurs types cellulaires, suggérant que les différents sérotypes utilisent chacun un récepteur et un co-récepteur donnés pour entrer dans la cellule (Rutledge, Halbert, et Russell 1998).

Différents sérotypes d'AAV ont été identifiés en tant que contaminants de préparation adénovirale. Par la suite, des études menées par le groupe de JM Wilson ont montré qu'il existait un nombre très important de sérotypes et de variants générés par recombinaison *in vivo* (G. Gao et al. 2003). Dans un premier temps, cette équipe a voulu isoler des sérotypes non plus à partir de tissus humains mais à partir de tissus de primates. Ils sont partis du principe que l'homologie entre l'Homme et les primates non-humains était suffisamment forte pour avoir des vecteurs issus de primates capables de transduire les mêmes cellules chez l'Homme (G.-P. Gao et al. 2002). De cette étude a émergé la découverte des sérotypes 7 et 8 isolés chez le primate rhésus. Une étude beaucoup plus exhaustive a ensuite été réalisée sur 108 individus (Homme et primates non-humains), le but premier étant de comprendre le mécanisme de latence et de persistance de l'AAV (G. Gao et al. 2004b). Basées sur la séquence VP1 de la capsid, les analyses phylogénétiques réalisées ont permis de regrouper par ensemble (*clade*) les différents sérotypes et de mettre en évidence l'existence d'hybrides générés à partir de recombinaison *in vivo* (**Figure 6**).



**Figure 6 : Analyses phylogénétiques des sérotypes et variants de l'AAV basées sur la séquence VP1.** Les ensembles A, B, C et F ont été isolés exclusivement chez l'Homme, l'ensemble D exclusivement chez le primate et l'ensemble E à la fois chez l'Homme et le primate. *Extrait de G. Gao et al. 2004b*

L'AAV2 a été le sérotype précurseur pour les essais cliniques de patients atteints de mucoviscidose (Wagner et al. 1998), d'hémophilie B (Kay et al. 2000) ou encore d'amaurose congénitale de Leber (Simonelli et al. 2010) car c'était le sérotype historiquement identifié et le mieux caractérisé. Grâce à des études chez des modèles de petits et gros animaux, les essais émergents font désormais souvent appel à d'autres sérotypes avec un tropisme aujourd'hui plus optimal pour un tissu donné. Il apparaît ainsi que les AAV de sérotypes 1, 6, 7, 8 et 9 transduiraient plus efficacement les muscles squelettiques. Par ailleurs, les sérotypes 6 et 9 cibleraient également le cœur, ce qui pourrait présenter un avantage notamment pour le traitement des atteintes cardiaques liées aux myopathies. Concernant le foie, les sérotypes 8 et 9 seraient les plus efficaces. Le système nerveux central serait quant à lui transduit de manière plus optimale par les AAV 9 et 10 et l'œil par les sérotypes 1, 4, 5, 7, 8 et 9 (**Tableau 2**). Pour l'œil, les différents sérotypes ne ciblent pas les mêmes cellules. En effet, l'AAV4 est décrit pour transduire préférentiellement les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Weber et al. 2003) alors que l'AAV5 va plutôt cibler les photorécepteurs (Lotery et al. 2003; Petit et al. 2012). Enfin, des sérotypes comme l'AAV9 et l'AAV10 apparaissent comme pertinents pour cibler le système nerveux central (Dayton, Wang, et Klein 2012 ; S J Gray et al. 2013 ; R. L. Klein et al. 2008). Certains de ces sérotypes sont d'ailleurs désormais utilisés dans des études précliniques et cliniques. En effet, l'AAV1 est aujourd'hui utilisé dans des essais cliniques ciblant le muscle chez des patients atteints de déficit en  $\alpha$ 1-antitrypsine (AAT) (Brantly et al. 2009 ; Flotte et al. 2011) ou en LPL (Stroes et al. 2009). Ce dernier est même le premier médicament de thérapie génique à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché (Ylä-Herttuala 2012). L'AAV de sérotype 6 apparaît comme prometteur pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (Raake et al. 2013), l'AAV8 est utilisé en clinique pour le traitement de patients atteints d'hémophilie B (Nathwani, Tuddenham, et al. 2011) et enfin, l'AAV4 est actuellement testé chez des patients atteints d'amaurose congénitale de Leber.

En plus de ces sérotypes naturels, depuis quelques années, de plus en plus d'études s'intéressent à l'optimisation de variants d'AAV. En effet, les capsides d'AAV sont modifiées afin d'échapper à la réponse immune ou d'augmenter le tropisme d'un AAV pour un tissu donné ou au contraire le diminuer. Pour cela, la modification peut consister à muter des motifs Tyrosine à la surface de la capside (Zhong et al. 2008) ou à créer des capsides chimériques entre deux sérotypes d'AAV (Bowles et al. 2012). C'est le cas par exemple de l'AAV2i8 qui vise à réduire le tropisme dans le foie et augmenter la transduction des muscles cardiaques et squelettiques (Asokan et al. 2010). A l'inverse, la modification peut avoir pour but d'adresser

plus préférentiellement l'AAV dans un tissu tel que le foie comme c'est le cas pour l'AAV2G9 (Shen et al. 2012).

Organe cible	Sérotype optimal	Références
Muscle squelettique	1, 6, 7, 8, 9	W. Xiao et al. 1999; Chao et al. 2000 ; Gregorevic et al. 2004 ; Zhong Wang et al. 2005,8
Cœur	6, 9	Zincarelli et al. 2010 ; Bish et al. 2012 ; Inagaki et al. 2006
Foie	8, 9	Vandendriessche et al. 2007 ; Inagaki et al. 2006
Système nerveux central	9,10	R. L. Klein et al. 2008 ; Dayton, Wang, et Klein 2012
Poumon	6, 9	Halbert, Allen, et Miller 2001, 6 ; Bostick et al. 2007
Œil	1, 4, 5, 7, 8, 9	Lebherz et al. 2008 ; Weber et al. 2003

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des sérotypes d'AAVr utilisés en transfert de gène et décrits comme optimaux pour un tissu donné.**

### 3. Trafic intracellulaire

Pour infecter ou transduire efficacement une cellule, l'AAV doit passer par trois étapes clés qui sont i) la liaison à la cellule et l'entrée, ii) le trafic intracellulaire jusqu'au noyau cellulaire et iii) l'entrée dans le noyau. Afin d'identifier les mécanismes de transduction de l'AAV, de nombreuses études ont été réalisées à partir d'AAV sauvages mais également à partir d'AAV recombinants *in vitro*.

La première étape nécessaire à l'entrée de l'AAV dans la cellule est sa fixation aux récepteurs et corécepteurs membranaires. Dans le cas de l'AAV2, le virus se lie au récepteur protéoglycane à héparane sulfate (Summerford et Samulski 1998) et est internalisé grâce aux corécepteurs. Plusieurs corécepteurs ont été identifiés à ce jour : l'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  (Summerford, Bartlett, et Samulski 1999) et les récepteurs FGFR I (fibroblast growth factor de type 1) (Qing et al. 1999) et c-Met (hepatocyte growth receptor) (Kashiwakura et al. 2005). Alors que le type de récepteurs et de corécepteurs varie en fonction du sérotype de l'AAV, certains restent encore inconnus (**Tableau 3**).

Sérotyp e	Récepteur	Co-récepteurs	Références
AAV1	Acide sialique N-lié	non identifié	Z. Wu et al. 2006
AAV2	Protéoglycane à héparane sulfate	FGFR I (fibroblast growth factor de type 1) Intégrine $\alpha_v\beta_5$ récepteur à la laminine (RL)	Summerford et Samulski 1998; Qing et al. 1999; Summerford, Bartlett, et Samulski 1999; Akache et al. 2006
AAV4	Acide sialique O-lié	non identifié	Kaludov et al. 2001
AAV5	Acide sialique N-lié	PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor)	Kaludov et al. 2001 ; Di Pasquale et al. 2003
AAV6	Acide sialique N-lié Protéoglycane à héparane sulfate	EGFR (epidermal growth factor receptor)	Z. Wu et al. 2006; Weller et al. 2010
AAV8	non identifié	récepteur à la laminine (RL)	Akache et al. 2006
AAV9	Galactose	récepteur à la laminine (RL)	Akache et al. 2006 ; Shen et al. 2011

**Tableau 3 : Récapitulatif des récepteurs et corécepteurs identifiés pour les différents sérotypes de l'AAV.**

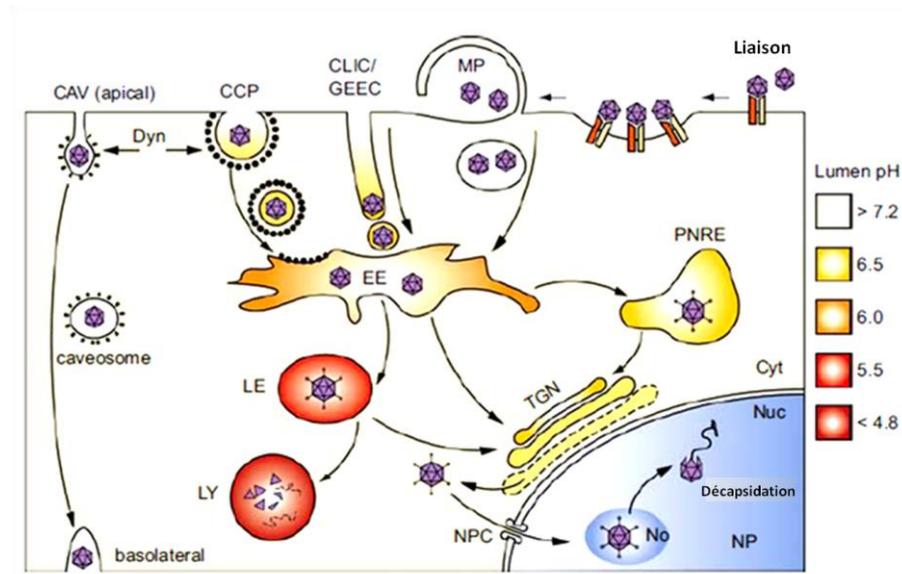
*D'après Asokan, Schaffer, et Samulski 2012*

Une fois fixé à la cellule, l'AAV est internalisé par invagination de la membrane plasmique contenant les complexes virus-récepteurs. Ces vésicules sont ensuite relarguées dans la cellule. Dans le cas de l'AAV, cette étape est relativement rapide puisqu'elle durerait entre 30 et 60 minutes (Bartlett, Wilcher, et Samulski 2000).

Les cellules possèdent plusieurs mécanismes d'invagination tels que l'endocytose médiée par la clathrine ou la cavéoline, la macropinocytose, la phagocytose ou encore d'autres voies indépendantes de la clathrine. La voie d'entrée de l'AAV dans la cellule est un sujet assez controversé. Il semblerait que la voie d'entrée de l'AAV2 soit majoritairement un mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine (Bartlett, Wilcher, et Samulski 2000) bien que récemment Nonnenmacher et Weber suggèrent que l'endocytose de l'AAV2r serait principalement médiée par une voie indépendante de la clathrine : la voie CLIC/GEEC (Nonnenmacher et Weber 2011).

Les vésicules subissent ensuite un processus d'acidification via les endosomes qui apparaît comme une étape clé dans l'adressage du virus au noyau. En effet, ce processus va permettre un changement de conformation de la capsid e, nécessaire à l'efficacité de transduction (Sonntag et al. 2006 ; Nam et al. 2011). L'AAV échappe ensuite aux endosomes

et se place de manière périnucléaire avant de pénétrer dans le noyau possiblement à travers le pore nucléaire. L'étape de transfert du génome viral n'est pas encore clairement définie. Différentes études suggèrent qu'il y aurait une translocation des particules dans le noyau avant le relargage de l'ADN (Bartlett, Wilcher, et Samulski 2000; Johnson et Samulski 2009) (**Figure 7**).



**Figure 7 : Modélisation de l'entrée et du trafic intracellulaire de l'AAV.** Après sa liaison aux récepteurs et corécepteurs, l'AAV entre dans la cellule par macropinocytose (MP) ou par endocytose médiée par l'une des voies suivantes : dépendante de la clathrine (CCP), de la cavéoline (CAV) ou indépendante de la clathrine (CLIC/GEEC). Les virions sont ensuite adressés au Golgi après avoir transité dans les endosomes précoces (EE) puis tardifs (LE) ou les endosomes de recyclage (PNRE). Ce transit induit un changement de conformation de la capsid qui permet à l'AAV d'échapper aux endosomes ou au Golgi et de pénétrer dans le noyau par l'intermédiaire du pore nucléaire (NPC). Le génome viral est ensuite relargué dans le noyau. *D'après M Nonnenmacher et Weber 2012*

#### 4. Mécanismes de réplication et vecteur double brin (scAAV)

Pour que la transduction des cellules soit optimale et que les protéines virales ou le produit du transgène soient exprimées, il est nécessaire que, une fois arrivé dans le noyau de la cellule, l'ADN simple brin soit converti en ADN double brin. Cette étape de conversion de l'ADN simple brin en double brin ou l'appariement de deux ADN simple brin apparaît comme assez controversée. Le génome de l'AAV possède toutes les séquences nécessaires à

cette conversion : les ITR servent d'amorces pour une ADN polymérase cellulaire après la décapsidation du génome viral dans la cellule-hôte. L'efficacité de transduction des cellules est, par ailleurs, augmentée en présence de virus auxiliaire ou d'agents génotoxiques. Cette augmentation corrèle avec l'augmentation de la formation de duplex d'ADN à partir du virion à génome simple brin (Alexander, Russell, et Miller 1994). Afin de déterminer quelles séquences des virus auxiliaires sont impliquées et indispensables à la réplication de l'AAV, un panel de mutations a été réalisé dans le génome de l'adénovirus. Les résultats suggèrent que la synthèse du brin complémentaire du génome de l'AAV est activée en présence de la région E4 de l'adénovirus, qu'elle soit apportée par le virus ou par une séquence plasmidique (Ferrari et al. 1996). En l'absence de cette séquence, la synthèse du brin complémentaire serait moins efficace et aboutirait à une baisse de l'efficacité de transduction des vecteurs AAV *in vitro*.

Alors que l'étape de synthèse du brin complémentaire du génome semble être une étape critique dans l'efficacité de transduction, une étude suggère que l'alignement des brins d'ADN complémentaires de deux particules serait importante dans la transduction et défend que la formation d'ADN double brin des AAV serait principalement due à l'assemblage des deux brins, plus qu'à la synthèse du brin complémentaire (Nakai, Storm, et Kay 2000b). Cependant, ce résultat a été contredit par une étude plus récente montrant qu'en utilisant des préparations d'AAV contenant uniquement des brins + ou uniquement des brins -, la transduction était aussi efficace qu'avec une préparation standard contenant un mélange de brins + et -, confirmant que la synthèse du second brin est le mécanisme majoritaire de conversion du génome AAVr en double brin (X. Zhou et al. 2008).

Dans le cadre d'un transfert de gène, cette étape de conversion ou d'alignement de séquences pourrait donc être limitante et aboutir à une baisse de l'efficacité de transduction. C'est pourquoi, les vecteurs AAV à ADN double brin ont fait leur apparition quelques années plus tard, ils seront dénommés scAAV (AAV self-complementary) en opposition aux ssAAV (AAV single-stranded). Ces vecteurs ont émergé suite à l'observation de la capacité des AAV à encapsider deux copies de génome viral si celui-ci fait la moitié de la taille maximale encapsidable (Dong, Fan, et Frizzell 1996). En effet, si la taille du génome de l'AAV est supérieure à la moitié, seule une copie sera encapsidée. Par contre, si la taille est inférieure à la moitié, des séquences dimériques pourront être encapsidées (Hirata et Russell 2000).

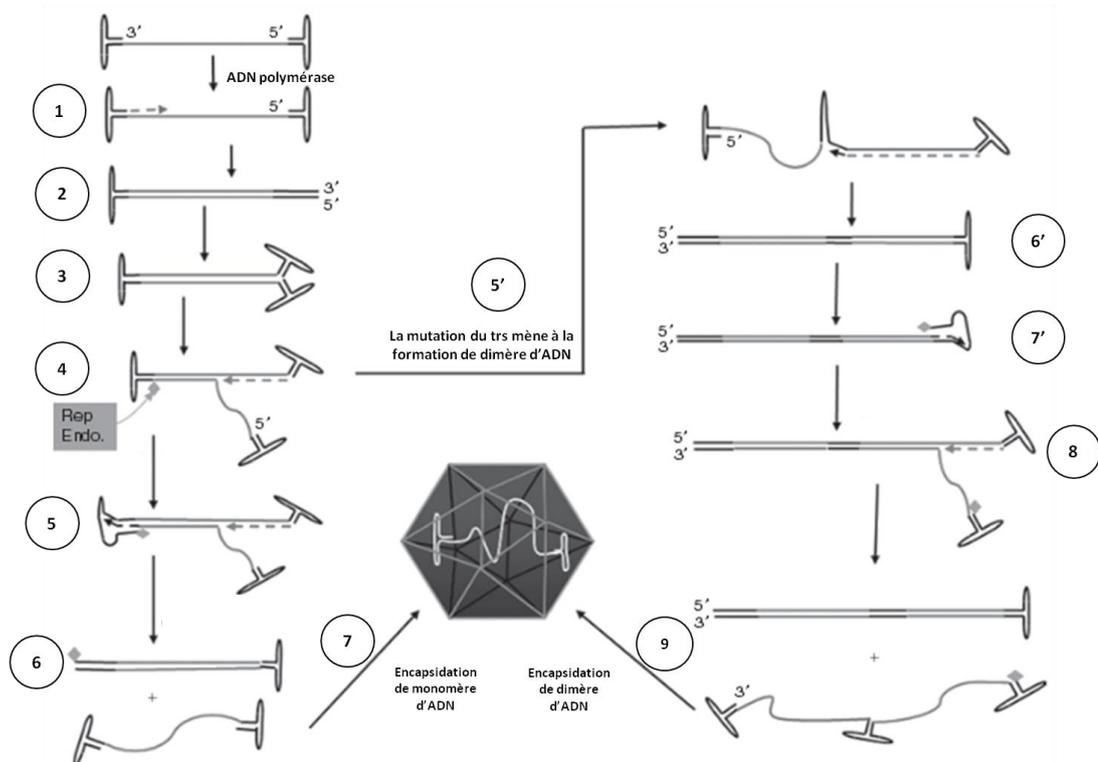
Sur la base de cette observation, les premiers vecteurs scAAV ont été produits avec des cassettes d'expression qui faisaient la moitié de la taille du génome de l'AAV sauvage de manière à encapsider deux molécules capables de s'apparier. Ces vecteurs scAAV ainsi produits ont montré une augmentation de l'efficacité de transduction par rapport aux ssAAV aussi bien *in vitro* dans des cellules HeLa qu'*in vivo* dans des hépatocytes murins (D M McCarty, Monahan, et Samulski 2001). Ces vecteurs double brin se sont avérés très efficaces puisque même les inhibiteurs de la réplication de l'ADN n'affectent pas l'efficacité de transduction contrairement à ce qui est observé pour les ssAAV.

Après avoir étudié la taille optimale du génome pour être encapsidé efficacement, McCarty *et al.* publie en 2003 une étude proposant une méthode pour produire directement des scAAV plutôt que d'avoir des populations mélangées de monomères génomiques (D M McCarty et al. 2003). Cette méthode est basée sur le cycle de réplication de l'AAV et sa capacité à générer des formes répliquatives de haut poids moléculaire. Elle consiste à introduire une mutation dans l'un des deux ITR : la délétion de la séquence trs nécessaire à la coupure de l'ADN viral en fin de réplication pour séparer les monomères de génome. La séquence du vecteur présente alors un ITR sauvage et un ITR mutant. La réplication débute à partir de l'ITR sauvage jusqu'à l'ITR mutant qui ne contient pas de signal de terminaison et continue, jusqu'à répliquer la totalité du génome en se servant du brin opposé en tant que matrice. A l'issue de l'étape de réplication, le produit présente donc l'ITR muté au milieu de son génome et un ITR sauvage à chaque extrémité. La mutation dans l'ITR permet alors une encapsidation prédominante de dimères génomiques capables de former un ADN double brin (Z Wang et al. 2003) (**Figure 8**).

Dans le but de valider la méthode de production et la fonctionnalité de ce nouveau produit, les vecteur scAAV ont été comparés aux vecteurs ssAAV aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'efficacité de transduction des vecteurs scAAV s'est révélée supérieure aux ssAAV *in vitro* dans une vingtaine de lignées cellulaires issues de rongeurs, d'humains ou de primates non-humains (Z Wang et al. 2003). *In vivo*, les résultats ont également montré une meilleure efficacité de transduction et une expression du transgène plus rapide dans le muscle, le foie et également le cerveau dans des modèles murins (Z Wang et al. 2003 ; D M McCarty et al. 2003).

Bien que ce type de vecteur ne soit pas applicable à toutes les pathologies compte-tenu de sa faible capacité d'encapsidation, il permet une meilleure efficacité de transduction des

cellules et une expression du transgène plus rapide, ce qui pourrait permettre de diminuer les doses injectées comparé à un vecteur ssAAV, et d'envisager de traiter certains tissus comme le foie dans lequel les ssAAV ont montré une faible efficacité (Z Wang et al. 2003). Ce type de vecteur scAAV a d'ailleurs été injecté il y a maintenant 3 ans à des patients atteints d'hémophilie B et montre une persistance de l'expression du transgène à des doses thérapeutiques (Nathwani, Tuddenham, et al. 2011).



**Figure 8 : Cycle de réplication de l'AAV et formation des génomes dimériques pour la production de scAAV.** Le virus à ADN simple brin entre dans le noyau la cellule où il est converti en ADN double brin grâce aux ITR qui servent de matrice à l'ADN polymérase. (1) Cette conversion est réalisée grâce à la fixation de l'ADN polymérase sur l'ITR 3'. (2) Le duplex ITR se replie en configuration d'épingle à cheveux pour former une nouvelle amorce pour la synthèse de l'ADN (3). La protéine Rep vient se lier à l'ITR (4). Rep induit une coupure au niveau du site trs induisant une seconde synthèse d'ADN pour synthétiser la fin de l'ITR (5). Les deux molécules se séparent et peuvent servir de matrice comme en étape 3 (6). Le monomère d'ADN simple brin peut être encapsidé. (7) des formes dimériques peuvent être encapsidées si la coupure au site trs n'a pas été efficace. (5') un des ITR est muté au niveau du site trs, la coupure n'a pas lieu. L'ADN simple brin est converti en ADN double brin (6') seul l'ITR non-muté est coupé au niveau du trs (7'). Comme en étape (5), Rep induit une coupure au niveau du site trs induisant une seconde synthèse d'ADN pour synthétiser la fin de l'ITR. Les deux molécules se séparent et peuvent servir de matrice comme en étape 3 (8). Le dimère d'ADN peut être encapsidé (9) *D'après D M McCarty 2008*

## 5. Méthodes de production des AAV recombinants

Aujourd'hui, les AAV recombinants sont le plus généralement générés après transfection transitoire de cellules avec un plasmide vecteur contenant la cassette d'expression entourée des ITR et un autre plasmide qui apporte les gènes *rep* et *cap* en *trans*. Les gènes du virus auxiliaire nécessaires pour la réplication et l'assemblage de l'AAV sont aussi apportés en *trans*. Le fait d'apporter ces séquences à l'aide d'un autre plasmide a, par ailleurs, permis de réduire la contamination en adénovirus et en particules AAV compétentes pour la réplication dans les préparations d'AAV recombinants (Salveti et al. 1998 ; X. Xiao, Li, et Samulski 1998 ; D Grimm et al. 1998).

Cette méthode historique de production de vecteurs recombinants pose désormais des limites concernant la quantité de vecteurs à produire. En effet, les premiers essais concernaient des modèles de petits animaux puis de gros animaux. Désormais, l'AAV recombinant est utilisé dans des essais cliniques chez l'Homme. Les quantités de vecteurs nécessaires ont été grandissantes d'un modèle à l'autre. Aujourd'hui, il semble donc nécessaire de trouver des méthodes alternatives pour produire de plus grandes quantités de vecteurs.

Parmi ces méthodes, on retrouve notamment i) l'utilisation de lignées cellulaires productrices stables (Toublanc et al. 2004) ou encore ii) le système de production en cellules d'insectes SF9 infectées par un baculovirus contenant les séquences auxiliaires nécessaires à la réplication (Urabe, Ding, et Kotin 2002). Ce dernier est aujourd'hui en pleine expansion et permet une production à grande échelle (en bioréacteur de 200 litres). Cette méthode permet, par ailleurs, la production de vecteurs qui semblent tout à fait comparable d'un point de vue physique et biologique à ceux produits par transfection transitoire (Urabe, Ding, et Kotin 2002 ; Cecchini, Virag, et Kotin 2011). Néanmoins, à ce jour, aucune comparaison d'un point de vue de l'efficacité de transduction ou d'un point de vue immunologique n'a été faite *in vivo*.

Bien que les vecteurs AAV soient aujourd'hui utilisés dans des essais cliniques, leur production et leur purification restent encore à améliorer. En effet, lors de la production de vecteurs, des séquences procaryotes peuvent être encapsidées et retrouvées *in vivo* (Chadeuf et al. 2005) tout comme de faibles quantités de particules compétentes pour la réplication

(Allay et al. 2011). Par ailleurs, il n'existe pas de standardisation de protocoles entre les laboratoires concernant la production ou la titration des vecteurs. Cela rend difficile la comparaison des études *in vivo*. C'est pourquoi, des équipes travaillent à l'établissement de matériel de référence standard pour caractériser les vecteurs (Moullier et Snyder 2008). Ces protocoles de caractérisation des productions de vecteurs sont aujourd'hui disponibles uniquement pour les AAV sérotypes 2 et 8 (Lock et al. 2010 ; Moullier et Snyder 2012).

Les vecteurs AAV apparaissent donc aujourd'hui comme des vecteurs de choix pour le traitement de maladies monogéniques. En effet, l'identification de nombreux sérotypes, l'encapsidation d'un génome double brin de l'AAVr ou encore l'optimisation de la production de ce vecteur sont des avancées qui ont permis d'utiliser ce produit dans des essais cliniques. Une limite majeure est cependant apparue lors de l'utilisation de ce vecteur chez l'Homme : la réponse immune dirigée contre la capsidite et/ou contre le produit du transgène.

### ***C. AAV recombinant et réponse immune***

L'immunité est définie comme un mécanisme ayant pour but de défendre l'organisme contre tout élément étranger, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou de parasites. Il existe deux types d'immunité : l'immunité innée précoce et non-spécifique et l'immunité adaptative plus tardive mais spécifique qui donne lieu à un phénomène de mémoire immunologique. Pour maintenir cette défense vis-à-vis des agents infectieux, l'organisme possède des tissus dits organes lymphoïdes qui ont pour but soit d'induire la différenciation des cellules immunitaires, on parlera d'organes lymphoïdes primaires, soit d'initier une réponse à l'encontre d'un agent pathogène, on parlera alors d'organes lymphoïdes secondaires.

L'AAVr a souvent été décrit comme peu immunogène comparé à des vecteurs comme l'adénovirus (Suzuki et al. 2013). Les hypothèses avancées étaient que l'AAVr induisait une faible activation de la réponse innée (Zaiss et al. 2002) et qu'il n'était pas capable de transduire efficacement les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Jooss et al. 1998). Ce dernier dogme a rapidement évolué suite à des études de transduction *in vitro* de cellules

dendritiques (DC) dérivées de monocytes murins ou humains à l'aide d'AAV de sérotype 1, 2, 5 et 6 (Aldrich et al. 2006 ; Veron et al. 2007 ; Veron et al. 2009).

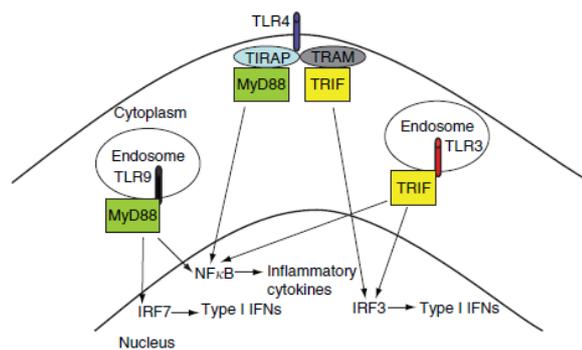
Aujourd'hui, l'AAVr est utilisé dans de nombreux essais cliniques ciblant le muscle, la rétine ou encore le foie. Alors qu'il permet une expression du transgène à long terme dans des modèles murins, la translation dans des modèles de gros animaux puis chez l'Homme a montré que l'AAVr peut se révéler immunogène. En effet, une réponse immune dirigée contre la capsid du vecteur et/ou le produit du transgène peut aboutir à une inefficacité du transfert de gène. Cette réponse semble cependant dépendre du tissu ciblé. En effet, la rétine semble être un site immunoprivilégié contrairement au foie ou au muscle. Aujourd'hui, un des défis de la thérapie génique est donc de comprendre et de mesurer cette réponse, qu'elle soit dirigée contre le vecteur viral ou contre le produit du transgène, mais surtout d'établir des stratégies permettant de contourner ou de minimiser son initiation.

## **1. Immunité innée**

La réponse immunitaire innée est déclenchée pendant les premières heures de l'infection. Cette réponse est initiée par la reconnaissance de motifs exprimés à la surface des pathogènes. Ces motifs dénommés PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptor). Ils peuvent reconnaître à la fois des acides nucléiques viraux ou des glycoprotéines membranaires (Kawai et Akira 2006). Parmi les PRR, on retrouve les TLRs (Toll-Like Receptor). Il y en a 13 décrits jusqu'ici. Ces récepteurs sont composés d'un domaine extracellulaire qui se lie aux PAMPs et d'un domaine intracellulaire TIR (Toll/IL-1R homology). Chaque TLR reconnaît un motif donné. Alors que les TLR qui reconnaissent des glycoprotéines vont se trouver à la surface des cellules, ceux reconnaissant les acides nucléiques vont plutôt se trouver à la surface des endosomes. Ces récepteurs sont, dans la plupart des cas, exprimés par les cellules immunitaires telles que les DC, les macrophages, les cellules Natural Killer (NK) ou encore les lymphocytes B (LB). Après la liaison à leur ligand, les TLR se dimérisent et induisent ainsi un changement de conformation. Ce changement de conformation permet le recrutement de molécules adaptatrices telles que MyD88 (myeloid differentiation primary response protein) ou TRIF (TIR domain containing adapter inducing interferon  $\beta$ ). Ce recrutement va déclencher une

cascade de signalisation qui aboutira à l'activation de facteurs de transcription : IRF (interferon regulatory factor) ou NFκB (nuclear factor κB) à l'origine de la production d'interférons (IFN) de type I ou de cytokines proinflammatoires respectivement (**Figure 9**).

Au début des années 2000, il était admis que les vecteurs AAV induisaient une faible réponse innée. Une étude s'est pourtant intéressée à l'expression de chimiokines inflammatoires à l'échelle de l'ARNm après injection par voie intraveineuse (IV) chez la souris d'un AAVr comparé à un vecteur adénoviral. Cette étude a montré que, bien que l'efficacité de transduction soit comparable, il fallait une dose supérieure d'AAVr pour induire la sécrétion de chimiokines dans le foie. Cette expression de chimiokines inflammatoires était transitoire et intervenait dès une heure post-injection, était détectable à six heures et disparaissait au bout de 24 heures (Zaiss et al. 2002).



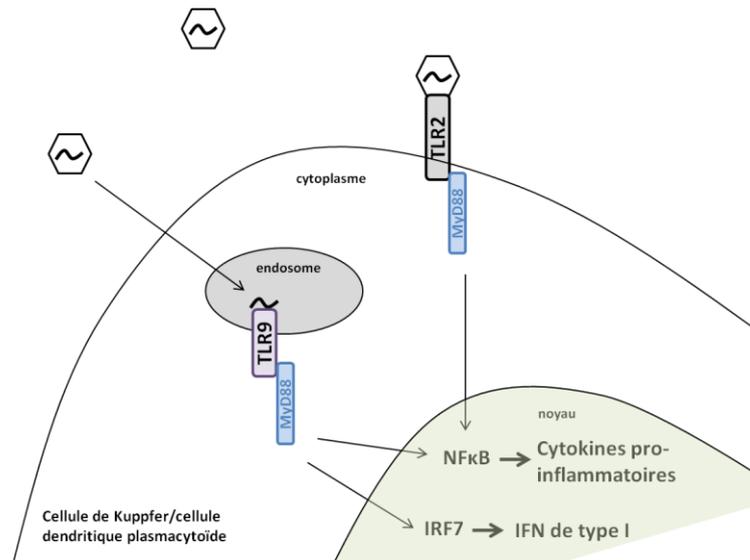
**Figure 9 : Voies de signalisation induites par les TLR.** Une fois liés à leur ligand, les TLR recrutent des molécules adaptatrices : MyD88 ou TRIF. La cascade de signalisation déclenchée aboutit à l'activation de facteurs de transcription : IRF qui va déclencher l'expression d'IFN de type I ou NFκB qui va déclencher l'expression de cytokines pro-inflammatoires. *Extrait de Hensley et Amalfitano 2007*

Pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette induction de réponse innée, des souris knock-out (KO) pour des gènes codant pour des TLR ou codant pour des molécules impliquées dans la cascade de signalisation du TLR telles que MyD88 ou TRIF (**Figure 9**) ont été injectées avec de l'AAVr (Zhu, Huang, et Yang 2009 ; Zhang et al. 2012). Il a ainsi été montré que le TLR9 et MyD88 étaient impliqués dans la réponse dirigée contre l'AAVr. Cette réponse pouvait être médiée par les interférons de type I sécrétés par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et non par les DC dites conventionnelles (cDC) (Zhu, Huang, et Yang 2009) ou par la sécrétion d'interleukine 6 (IL6), d'IL1β, de MCP1

(monocyte chemoattractant protein-1) et de MIP2 (macrophage inflammatory protein-2), cytokines et chimiokines impliquées dans la phase aiguë de l'inflammation, au site d'injection (Faust et al. 2013). De plus, ces résultats suggèrent de manière indirecte que les AAVr sont capables de transduire les DC *in vivo*. En effet, le TLR9 est décrit comme un récepteur se trouvant à la surface des endosomes de ces cellules (Latz et al. 2004 ; Ahmad-Nejad et al. 2002 ; Ketloy et al. 2008).

Les TLR9 sont connus pour reconnaître à la fois les ADN double brin et les ADN simple brin portant des motifs CpG non-méthylés (Hornung et al. 2002). Lors d'une infection, ces TLR9 sont surexprimés. Le niveau d'expression du TLR9 a donc été étudié chez la souris, après transfert de gène par voie hépatique d'un vecteur ssAAV ou scAAV. Ainsi, les vecteurs scAAV induisent une plus forte réponse inflammatoire que les vecteurs ssAAV et ce, indépendamment de la souche de souris et du promoteur utilisés. Cette réponse, dépendante du TLR9, entraîne une augmentation de la réponse cellulaire dirigée contre la capsidite mais pas contre le produit du transgène (Martino et al. 2011). Cela est probablement dû au fait que les signaux inflammatoires sont délivrés au moment où seuls les antigènes de la capsidite sont présents. Le produit du transgène ne sera exposé qu'après la décapsidation du génome viral et sa transcription. L'hypothèse de cette étude pouvant expliquer cette réponse inflammatoire plus importante après transfert de gène à l'aide de vecteurs scAAV est que les capsidites de ces vecteurs sont moins stables dans les endosomes et relarguent plus de génome viral qui est ensuite capté par les TLR9. Par ailleurs, des génomes viraux déplétés en motifs CpG semblent induire une plus faible réponse (Faust et al. 2013). Dans cette étude, cela était corrélé à une diminution du nombre de CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II) exprimés au site d'injection et une absence de réponse adaptative dirigée contre la capsidite ou le produit du transgène.

Enfin, il semblerait que le TLR9 ne soit pas le seul TLR impliqué dans la réponse innée induite par les vecteurs AAV. En effet, après transfert de gène dans le foie de souris, des cytokines pro-inflammatoires peuvent être sécrétées par les cellules de Kupffer et les cellules non-parenchymateuses du foie. L'activation ne se fait alors plus via le TLR9, exprimé dans les pDC, mais via le TLR2 qui reconnaît des motifs de l'AAV en tant que PAMPs. L'implication du TLR2 entraîne alors une activation de la voie de signalisation NFκB (Jayandharan et al. 2011; Hösel et al. 2011) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Activation de la réponse immunitaire innée après transfert de gène à l'aide d'AAVr.** Le TLR2 exprimé à la surface des cellules de Kupffer reconnaît le vecteur viral, le TLR9 exprimé à la surface des endosomes dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes reconnaît quant à lui l'ADN viral. Pour ces deux récepteurs, la molécule MyD88 est recrutée et entraîne l'activation de NFκB qui induira la production de cytokines pro-inflammatoires ou de IRF7 qui induira la sécrétion d'IFN I.

Alors que les TLR semblent impliqués dans la réponse innée contre l'AAVr, le système du complément, autre composant de la réponse innée, semble également être un élément important dans sa régulation. Le système du complément est composé de trois voies : la voie alterne, la voie classique et la voie des lectines. Le déclenchement de ces voies diffère en matière de protéines impliquées dans la liaison au pathogène mais toutes trois aboutissent à la formation de la C3 convertase. Cette enzyme a pour propriété de cliver la protéine C3 en deux fragments : C3a et C3b. Ce dernier agit comme une opsonine et est nécessaire à la formation de la C5 convertase. Celle-ci mène aux étapes finales de l'activation du système du complément entraînant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire. Une étude a montré que la capsid de l'AAV2r était capable d'interagir *in vitro* avec le système du complément et notamment avec la protéine iC3b et le facteur H (A. K. Zaiss et al. 2008). Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de l'activation du complément. En effet, le facteur H se lie au composant C3b et permet ainsi le recrutement du facteur I capable de cliver le C3b en iC3b, un fragment inactif. Leur présence entrainerait donc l'incapacité du vecteur à activer la voie alterne. Néanmoins, la liaison de l'AAVr à d'autres composants de la protéine C3 (C3 et C3b) suggère que le vecteur peut être opsonisé et entraîner l'activation des macrophages par la voie classique. De plus, l'interaction entre l'AAVr et le système du

complément semble agir sur la régulation de la réponse humorale dirigée contre l'AAVr puisqu'elle paraît diminuée dans un modèle de souris KO pour la protéine C3 (A. K. Zaiss et al. 2008). Ces données couplées au rôle joué par la voie de signalisation TLR9/MyD88 dans l'initiation de la réponse humorale dirigée contre la capsid de l'AAV1 chez la souris (Sudres et al. 2012) souligne l'impact direct de la réponse innée sur le type de réponse adaptative.

Bien que ces modèles murins aident à comprendre les facteurs et les mécanismes impliqués dans la réponse innée dirigée contre l'AAVr, ils présentent des limites (Hösel et al. 2011). D'une part, parce que les compositions des PRR diffèrent entre les rongeurs et l'Homme et d'autre part, parce que ces études n'utilisent pas toutes le même modèle. En effet, le fond génétique des souris, la méthode de production du vecteur ou encore la voie d'administration sont des facteurs qui peuvent influencer la réponse immune. Ces études se rejoignent pourtant sur l'implication de la voie de signalisation TLR9/MyD88 dans la réponse innée anti-AAVr. Un intérêt est donc porté au développement de stratégies permettant de bloquer cette voie de signalisation.

## **2. Immunité adaptative**

L'injection d'AAVr dans des modèles de gros animaux et plus récemment chez l'Homme a montré qu'il était capable d'induire aussi bien une réponse humorale que cellulaire, qu'elle soit dirigée contre la capsid et/ou le produit du transgène. Ainsi, ces réponses se sont avérées problématiques en matière d'efficacité du transfert de gène à long terme. C'est d'ailleurs parce que ces réponses ont été observées que les recherches sur l'immunogénicité de l'AAVr ont été initiées.

L'initiation de la réponse adaptative se déroule en trois étapes : i) la capture des antigènes et leur présentation aux lymphocytes, ii) l'activation des lymphocytes et iii) la différenciation en cellules effectrices ou cellules mémoires qui sont les médiateurs des réponses humorale et cellulaire.

## a) Capture des antigènes et présentation aux lymphocytes

Les antigènes sont capturés par des APC et drainés dans les organes lymphoïdes secondaires : les ganglions lymphatiques et la rate. Parmi les cellules présentatrices d'antigènes on retrouve les macrophages, les LB et les DC. Les DC sont définies comme des APC professionnelles car ce sont les seules cellules capables d'initier une réponse primaire des lymphocytes T (LT).

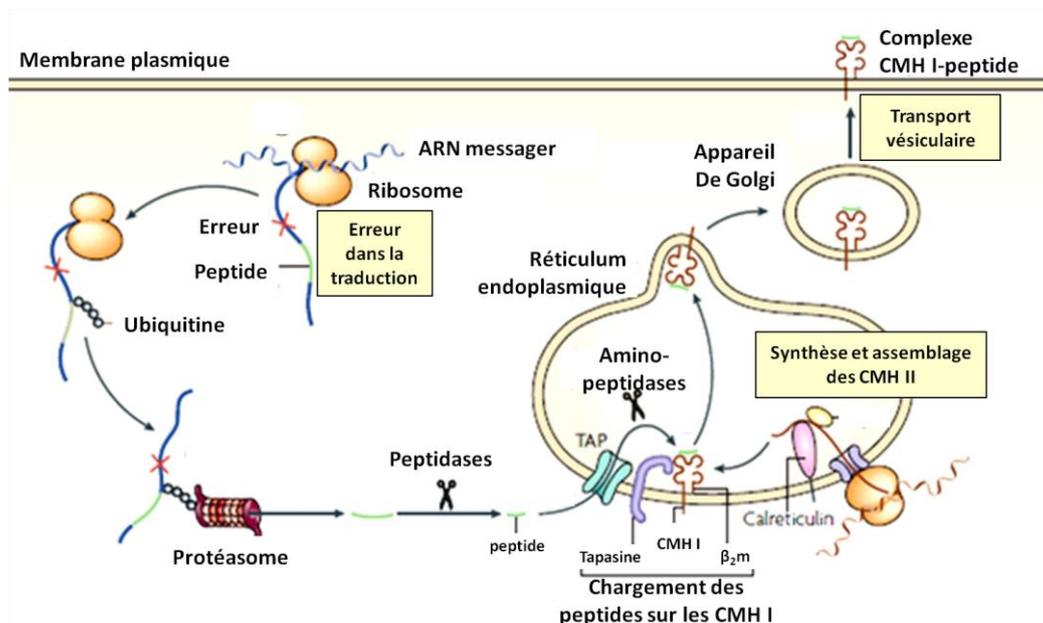
Les DC possèdent plusieurs rôles dans le contrôle de la réponse immune adaptative : elles peuvent être i) des sentinelles pour optimiser la capture d'antigènes *in situ*, ii) des initiateurs de la réponse immune par l'interaction les LB ou les LT ou iii) des initiateurs de la tolérance.

Les DC sont retrouvées à l'état immature dans tout l'organisme : les organes non-lymphoïdes, le sang, les vaisseaux afférents de la lymphe ou encore les tissus lymphoïdes. A l'état basal, elles n'expriment pas de signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes. Les DC sont capables de capter des antigènes ou de cliver des motifs pour donner naissance à des peptides. Les antigènes solubles qui se trouvent dans la lymphe sont captés par les DC des ganglions lymphatiques alors que les antigènes qui se trouvent dans le sang sont captés par les DC de la rate. Suite à la rencontre avec le pathogène, les DC mûrissent et augmentent l'expression des molécules de co-stimulation et d'adhésion à leur surface. Elles migrent ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux afférents qui les mènent aux zones T-dépendantes où elles activent les lymphocytes. Il est couramment admis que seulement quelques DC ainsi activées sont capables d'induire une forte réponse cellulaire (Banchereau et Steinman 1998).

Les DC sont capables de stimuler aussi bien la réponse cytotoxique médiée par les LT CD8 que la réponse *T-helper* médiée par les LT CD4. Dans le cas d'une initiation d'une réponse cytotoxique, les DC présentent à leur surface les peptides chargés sur une molécule de CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité de type I). Ces peptides peuvent provenir soit de la dégradation d'antigènes protéiques intracellulaires (**Figure 11**) soit de la captation, par les DC, d'antigènes exogènes provenant de cellules infectées en périphérie (Groothuis et Neefjes 2005). On parle alors de présentation croisée ou *cross-presentation*. Dans le cas d'une initiation d'une réponse de type *T-helper*, les DC présentent à leur surface

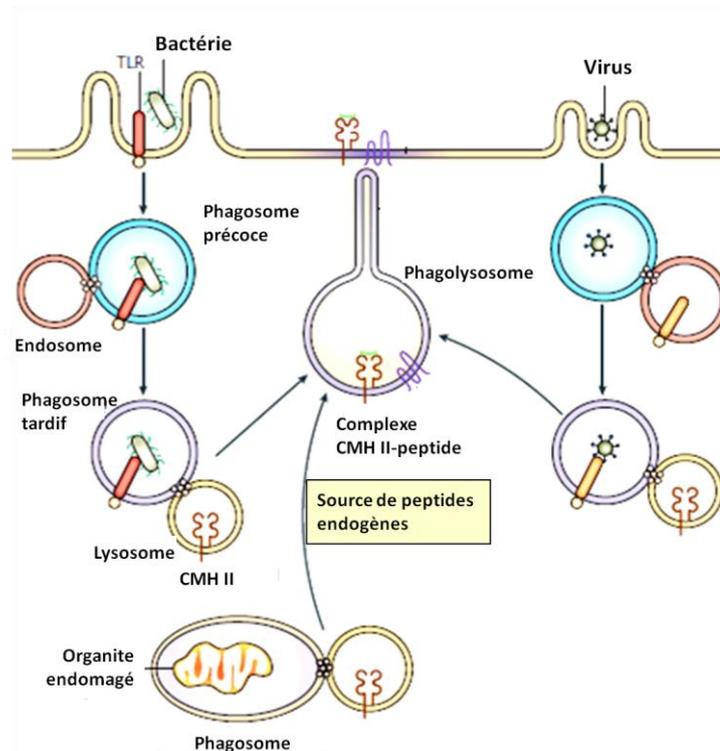
les peptides chargés sur une molécule de CMH II (**Figure 12**). Ces peptides proviennent de la dégradation d'antigènes extracellulaires.

Pour que l'activation soit complète, en plus du signal 1 correspondant à l'interaction entre l'APC chargée en complexe CMH-peptide et les lymphocytes, un signal 2 est nécessaire pour l'activation de ces lymphocytes (**Figure 13**). Ce signal 2 correspond à l'interaction de molécules de co-stimulation présentes sur les DC avec leurs récepteurs exprimés à la surface des LT : les interactions B7/CD28 et CD40/CD40 Ligand (CD40L) (Zheng, Zha, et Gajewski 2008). En l'absence de ce signal, les LT n'entrent pas en prolifération (Larsen et al. 1992). Si le signal 1 n'est pas présent, on parle d'ignorance, si c'est le signal 2 qui n'est pas présent on parle alors d'anergie. Lorsque les LT sont en état d'anergie, ils sécrètent peu d'IL2 nécessaire à leur survie et à leur prolifération mais également peu d'IFN $\gamma$ . Dans les deux cas, il n'y aura pas de réponse proliférative lymphocytaire vis-à-vis de l'antigène.



**Figure 11 : Chargement de peptides à la surface du CMH de classe I.** Les antigènes peptidiques sont captés dans le réticulum endoplasmique (RE) là où les CMH I sont assemblés. Les protéines destinées à la dégradation subissent une ubiquitination et sont prises en charge par le protéasome. La production d'IFN $\gamma$  suite à une infection virale mène au recrutement de protéines dans le protéasome et augmente la production d'octamère-décamère capables de se lier aux CMH I. Ces peptides sont transportés du cytoplasme vers le RE par l'intermédiaire du complexe TAP (transporter associated with antigen processing) où ils s'associent à une molécule du CMH I. Le complexe est ensuite délivré à la surface de la cellule et présenté aux LT CD8. *D'après Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008*

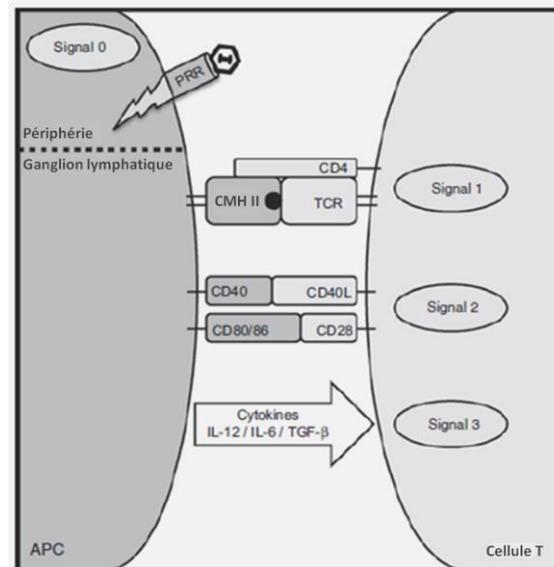
Enfin, la reconnaissance de l'antigène sans stimulation peut également induire une inhibition de la réponse plutôt qu'une anergie. En effet, les LT peuvent exprimer le ligand CTLA4 qui peut se lier à B7 mais qui délivre, contrairement au CD28, un signal inhibiteur aux LT. Cette interaction a notamment lieu lorsque les APC présentent des antigènes du soi à leur surface. Des stratégies d'immunomodulation, notamment dans la prévention du rejet de greffe, ciblent d'ailleurs cette voie (Bonham et al. 2002 ; Poirier et al. 2010).



**Figure 12 : Chargement de peptide à la surface du CMH de classe II.** Les antigènes extracellulaires sont captés par les APC et sont adressés au phagosome. Le phagosome fusionne avec le lysosome pour former le phagolysosome dans lequel, l'antigène interagit avec les CMH II. Les peptides chargés à la surface des CMH II sont transportés à la surface de la cellule où ils sont présentés aux LT CD4. *D'après Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008*

Le transfert de gène à l'aide d'un vecteur viral semble donc propice à l'initiation d'une réponse immune puisqu'il amène d'une part des antigènes issus de sa capsidie et d'autre part des antigènes issus du produit du transgène. En effet, dans le cas d'une maladie monogénique due à une mutation nulle, la protéine fonctionnelle synthétisée à partir du génome viral ne sera pas reconnue comme une protéine du soi. Cela s'est d'ailleurs vérifié dans les modèles

animaux puis chez l'Homme où des réponses humorale et cellulaire ont été observées à l'encontre de la capside et/ou du produit du transgène.



**Figure 13 : Signaux nécessaires à l'activation d'un lymphocyte.** Le signal 1 est délivré par l'interaction entre le complexe CMH-peptide et le TCR. Le signal 2 correspond à la liaison des molécules de co-stimulation à leur récepteur. Le signal 3 est délivré par l'environnement cytokinique. *Extrait de Mays et Wilson 2011*

## b) Réponse humorale médiée par les LB

Les LB mûrissent essentiellement dans la moelle osseuse et sont les médiateurs de l'immunité humorale. En effet, ce sont les lymphocytes producteurs d'anticorps. Ces réponses anticorps peuvent être de deux types : T-dépendante ou T-indépendante.

La réponse humorale est classiquement déclenchée par l'interaction entre un LT Th2 (lymphocyte *T-helper* 2) et un LB dans les organes lymphoïdes secondaires. Elle se traduit par la sécrétion d'anticorps aussi appelés immunoglobulines (Ig).

Les LB naïfs résident dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires. L'antigène arrive dans les organes lymphoïdes secondaires via les vaisseaux afférents de la lymphe sous forme de molécule soluble, de complexe immun ou encore transporté par les DC. Les LB se trouvant dans les follicules reconnaissent l'antigène protéique par l'intermédiaire de leur BCR (B-cell receptor). Cette reconnaissance entraîne l'internalisation du complexe

BCR-antigène qui fournit un premier signal d'activation. Le LB joue alors un rôle d'APC qui va lui permettre de solliciter les LT Th2. En effet, après internalisation du complexe, l'antigène est clivé en peptide antigénique qui est ensuite associé à une molécule du CMH II. Ce complexe CMH II-peptide est alors exprimé à la surface du LB et interagit avec un TCR (T-cell receptor) exprimé par les LT Th2. L'interaction se fait à l'interface entre les follicules comprenant les LB et la zone des LT. Cette interaction active le LT qui va fournir un deuxième signal d'activation au LB. Ce signal correspond à l'interaction entre CD40L exprimé à la surface des LT et CD40 exprimé par les LB. Ces derniers vont d'abord proliférer puis se différencier en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps et enfin en cellules mémoires (Larosa et Orange 2008).

Il existe différents isotypes d'Ig parmi lesquelles on retrouve les IgM qui jouent un rôle dans la réponse immune primaire : en effet, ces Ig exprimées à la surface des LB répondent rapidement à une variété d'antigènes. Les IgG, quant à elles, sont prédominantes dans le corps et ont une longue durée de vie. Chez l'Homme, quatre sous-classes ont été identifiées : les IgG1, 2, 3 ou 4. En général, elles ne sont pas représentées en même nombre dans la circulation, et notamment dans le sérum : la prédominance est telle que  $IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4$  chez l'Homme (Papadea et Check 1989). Alors que les IgG1 et 3 seraient plutôt produites en réponse à un antigène protéique, les IgG2 et 4 seraient associées à des polysaccharides (Schroeder et Cavacini 2010).

Les anticorps sont les médiateurs de la réponse humorale et répondent à des antigènes exogènes. Ils peuvent avoir un effet neutralisant puisqu'en se liant aux pathogènes ou aux toxines, ils facilitent l'opsonisation et activent la voie classique du système du complément. De manière non surprenante, ils ont été détectés dans le cadre de protocoles de transfert de gènes à l'aide d'AAVr dans différents modèles animaux mais également chez l'Homme. Dans ces modèles, il a été montré que des anticorps et des facteurs neutralisants pouvaient être dirigés contre la capsid.

## **(1) Réponse humorale dirigée contre la capsid de l'AAV**

L'homme est un hôte naturel de l'AAV et comme nous avons pu le voir précédemment, après l'activation du système immunitaire par un pathogène, l'individu conserve une mémoire immunologique. Elle se traduit par la présence de cellules mémoires capables de se réactiver rapidement et par la présence d'anticorps qui ont une longue durée de vie. Des études ont donc été réalisées pour étudier la présence d'anticorps sériques et de facteurs neutralisants dirigés contre la capsid chez l'Homme (Chirmule et al. 1999 ; Erles, Seböková, et Schlehofer 1999 ; Boutin et al. 2010). Ces études s'intéressaient principalement aux AAV2 mais aussi aux AAV de sérotypes 1, 5, 6, 8 et 9. Il a ainsi été montré que ce sont les anticorps et les facteurs neutralisants dirigés contre l'AAV2 qui montrent la plus grande prévalence quelle que soit la région du monde : sur le continent américain, en Afrique, en Europe, au Japon ou encore au Brésil. L'AAV2 est suivi par l'AAV1. Par contre, les individus semblent montrer une plus faible séropositivité envers les sérotypes 7 et 8 isolés chez le primate (Calcedo et al. 2009). L'analyse des sous-types d'Ig impliquées dans la réponse anti-AAV a montré que les IgG1 seraient dominantes, suggérant la présence d'une réponse T-dépendante. Néanmoins, les autres sous-types IgG2, IgG3 et IgG4 seraient également présents (Murphy et al. 2009 ; Madsen et al. 2009 ; Boutin et al. 2010). Enfin, la séroconversion semble avoir lieu très tôt au cours de la vie laissant une fenêtre thérapeutique restreinte pour s'affranchir de ces facteurs neutralisants : entre 7 et 11 mois pour l'AAV2 et jusqu'à 3 ans pour l'AAV8 (Calcedo et al. 2011).

L'immunité préexistante dirigée contre l'AAV peut donc altérer l'efficacité du transfert de gènes notamment s'il s'agit d'une réponse neutralisante (Moskalenko et al. 2000 ; Scallan et al. 2006). Il est alors apparu comme pertinent de privilégier l'utilisation de sérotypes moins prévalents que l'AAV2, comme l'AAV8, même s'il a été montré qu'il existe une réaction croisée entre les sérotypes (Calcedo et al. 2009). Cette réaction croisée est sans doute due aux fortes homologies entre les différentes capsides. L'AAV6 par exemple ne diffère que de 6 acides aminés avec l'AAV1. Les AAV de sérotype 7 et 8, quant à eux, ne sont pas neutralisés par des antisérums hétérologues chez la souris (G.-P. Gao et al. 2002). D'ailleurs, concernant le sérotype 8, le titre en facteurs neutralisants a été étudié pour déterminer jusqu'à quel niveau il est possible d'outrepasser cette barrière. Le titre correspond

ici à la dernière dilution à laquelle le sérum entraîne une inhibition de 50% de la transduction. Il en est ressorti que le titre maximal en facteurs neutralisants ne doit pas être supérieur à 1/10 si le vecteur est injecté par voie IV (Wang et al. 2011). Cependant, il a été montré que, pour ce sérotype, l'augmentation de la dose injectée peut permettre de dépasser la neutralisation (Hurlbut et al. 2010). En plus du sérotype, la voie d'injection semble être un facteur intervenant dans la neutralisation du vecteur. Cela a notamment été décrit pour l'AAV9r utilisé pour cibler le système nerveux central : une administration du vecteur dans la grande citerne chez un individu séropositif entraîne une inhibition de la transduction (Samaranch et al. 2012). Ce n'est pas le cas pour une injection du même sérotype par voie intrathécale où des titres allant jusqu'à 1/128 n'entraînent pas d'inhibition de la transduction (Gray et al. 2013).

L'utilisation de sérotypes alternatifs au sérotype 2 semble donc permettre au vecteur de transduire efficacement les tissus cibles même en présence de facteurs neutralisants. Cependant, nous avons pu voir que l'efficacité de transduction de ces vecteurs dépend de plusieurs facteurs comme la voie d'injection, la dose de vecteur ou encore le titre en facteurs neutralisants. Une alternative pour contrer la présence de facteurs neutralisants est d'ailleurs en cours de développement : la plasmaphérèse. Cette technique déjà utilisée chez l'Homme, permet d'éliminer des protéines de haut poids moléculaires comme les Ig dans le plasma. L'effet d'une à cinq plasmaphérèses sur les titres en facteurs neutralisants spécifiques des AAV1, 2, 6 et 8 a été mesuré chez des patients séropositifs. Comme cela a été décrit pour l'AAV8, la plasmaphérèse ne semble efficace que si le taux en facteurs neutralisants pré-existants est faible (aux alentours d'un titre au 1/20) et si plusieurs cycles sont effectués pour pallier un rebond de la réponse humorale pouvant entraîner une augmentation du taux d'anticorps. Cette technique permettrait alors de créer une fenêtre pendant laquelle le vecteur pourrait être administré. Il est cependant à noter qu'au-dessus d'un certain titre en facteur neutralisants (entre 1/20 et 1/800 et plus), il paraît nécessaire de coupler les cycles de plasmaphérèse à un régime immunosuppresseur agissant sur les LB (Monteilhet et al. 2011).

A l'heure actuelle, nous ne disposons donc pas encore de méthodes permettant de s'affranchir complètement de la réponse pré-existante anti-AAV.

En plus de cette immunité pré-existante décrite dans les modèles animaux et chez l'Homme, les études de transfert de gène à l'aide d'AAVr ont montré que le déclenchement d'une réponse immune humorale anti-AAV est systématique chez des individus séronégatifs. Cela a été montré dans des modèles murins, dans des modèles de gros animaux et plus

récemment dans des essais cliniques chez l'Homme. En effet, ce phénomène a été décrit chez la souris après transfert de gène par voie IM à l'aide d'un AAV2r codant pour l'AAT (Chirmule et al. 2000) ou à l'aide d'AAV2r ou 8 codant pour le FIX (Hua Li et al. 2007). Cela a également été décrit chez le chien après injection d'un AAV2r par voie transveineuse périphérique (Haurigot et al. 2010), chez le primate après injection par voie hépatique d'AAV5r ou d'AAV8r (Nathwani et al. 2007 ; Jiang et al. 2006) et enfin dans des essais cliniques en cours ciblant les déficits en AAT ou en FIX (Flotte et al. 2011; Nathwani, Rosales, et al. 2011). L'apparition de cette réponse humorale dirigée contre la capsid du vecteur ne semble dépendre ni de l'espèce, ni du sérotype, ni de la voie d'injection.

Il est cependant à noter que cette réponse n'apparaît pas délétère vis-à-vis du produit du transgène puisqu'elle n'aboutit pas à l'inefficacité de transfert de gène. Elle a pourtant un rôle limitant pour la ré-administration du vecteur excepté dans un site immunoprivilégié comme l'œil où la séroconversion ne semble pas être un obstacle (Amado et al. 2010 ; Bennett et al. 2012). Dans des études ciblant le foie ou le muscle, une deuxième administration d'un vecteur de même sérotype entraîne une inefficacité du transfert de gène et ce, que le vecteur code pour le même gène rapporteur ou un transgène thérapeutique (W. Xiao et al. 1999 ; Chirmule et al. 2000 ; Scallan et al. 2006). Par contre, une deuxième administration d'un vecteur de sérotype différent du premier ne semble pas aboutir à la perte d'expression du transgène. En effet, cela a notamment été montré dans un essai clinique chez des patients atteints de déficit en LPL. Certains individus avaient déjà reçu un AAV2r en IM (Brantly et al. 2006) avant d'être injecté avec un AAV1r par la même voie. La présence de facteurs neutralisants contre l'AAV2r n'a pas empêché le transfert de gène avec l'AAV1r (Brantly 2009).

L'existence d'une réponse humorale, pré-existante ou induite, dirigée contre la capsid de l'AAV est donc problématique pour le transfert de gène à l'aide d'AAVr. Il est à noter que le transfert de gène à l'aide d'AAVr peut également induire une réponse humorale dirigée contre le produit du transgène.

## **(2) Réponse humorale dirigée contre le produit du transgène**

La réponse immune dirigée contre le produit du transgène a été décrite plus largement dans des modèles de gros animaux que de petits animaux. Elle peut être dirigée contre une protéine autologue ou hétérologue et ce, dans différents modèles. Une étude réalisée chez le primate dans le cadre du transfert de gène de l'érythropoïétine (Epo) a montré que suite à l'initiation d'une réponse immune contre l'Epo homologue, les primates développaient une anémie auto-immune. Cette réponse était caractérisée par la présence d'anticorps dirigés contre l'Epo (Chenuaud et al. 2004b ; G. Gao et al. 2004a). Ce phénomène de réponse immune contre un produit du transgène a également été décrit chez le chat déficient en LPL après transfert de gène dans le muscle d'un transgène codant pour cette enzyme (Ross et al. 2006) ou encore chez le chien hémophile, contre le FIX (R W Herzog et al. 2001). Dans les deux cas, la perte d'expression de la protéine corrélait avec l'apparition d'anticorps spécifiques du produit du transgène. Cette réponse immune était cependant abrogée en présence d'un traitement immunosuppresseur.

Différents facteurs semblent impliqués dans l'initiation d'une réponse humorale dirigée contre le produit du transgène. Parmi eux, la dose de vecteur injectée peut jouer un rôle dans l'initiation mais aussi dans l'intensité de la réponse immune. En effet, le traitement de chiens hémophiles par voie IM avec un AAV2 codant pour le FIX a montré qu'en fonction de la dose totale injectée rapportée au poids et en fonction de la quantité de vecteur administrée à chaque site d'injection, la quantité en anticorps neutralisants contre le FIX et leur durée de vie augmentent (R W Herzog et al. 2002). Non seulement, la concentration en anticorps sériques IgG1 et IgG2 dirigés contre le FIX augmentent avec les doses de vecteur injectées mais aussi l'inflammation au site d'injection caractérisée par des infiltrats de LT CD8 et la destruction des fibres musculaires (Wang et al. 2005). Ce phénomène d'effet de la dose a été décrit dans le cadre d'un transfert de gène dans le muscle mais il existe aussi après transfert de gène hépatique. Dans ce cas, l'augmentation de la dose semble plutôt induire une tolérance vis-à-vis du produit du transgène. En effet, des souris CD-1 décrites comme présentant une forte réponse neutralisante vis-à-vis du FIX ne présentaient plus cette réponse neutralisante lors de l'injection de  $4 \times 10^{11}$  ou  $2 \times 10^{12}$  génomes viraux (vg)/animal par voie intraportale comparée à une même injection de  $1 \times 10^{11}$  vg/animal (Mingozzi et al. 2003).

L'état pathologique du tissu cible et le promoteur en amont du transgène, apparaissent également comme critiques pour l'efficacité du transfert de gène et concernent plus particulièrement les dystrophies musculaires. En effet, l'injection de vecteur AAV peut ne pas aboutir à une persistance de l'expression du transgène si elle a lieu dans un tissu inflammatoire et endommagé. C'est notamment le cas pour un modèle de souris déficientes en  $\gamma$ -sarcoglycane (Cordier et al. 2001).

Une expression ectopique d'une protéine peut également favoriser l'initiation d'une réponse immune. Dans le modèle cité ci-dessus, l'apparition de la réponse humorale disparaissait lors de l'utilisation d'un promoteur MCK (muscle creatine kinase) spécifique du muscle comparé à un promoteur ubiquitaire CMV (cytomegalovirus) (Cordier et al. 2001). Cela a également été montré dans des modèles murins où des vecteurs AAV2 ou AAV8 codaient pour l' $\alpha$ -galactosidase et l' $\alpha$ -glucosidase acide respectivement. Ces transgènes sous contrôle d'un promoteur CMV induisaient une plus forte réponse anticorps comparé à l'utilisation de la même cassette d'expression sous contrôle cette fois d'un promoteur spécifique du foie (Ziegler et al. 2004 ; Franco et al. 2005).

Enfin, le modèle animal a aussi un rôle : des souches différentes de souris ne vont pas induire la même réponse immune. En effet, alors qu'une forte réponse immune contre le FIX est détectée chez les souris CD-1, ce n'est pas le cas chez les souris C57/Bl6 (Kung et al. 1998). Cela a aussi été décrit pour des réponses contre des protéines hétérologues comme la GFP (Skelton, Satake, et Kohn 2001). De plus, des modèles animaux présentant différentes mutations pour une pathologie donnée ne vont pas non plus réagir de la même façon. Des chiens atteints d'hémophilie B portant une mutation non-sens sur le gène du FIX ne vont pas déclencher de réponse immune contre le FIX contrairement à ceux présentant une mutation nulle qui vont développer une forte réponse neutralisante contre le FIX après une injection par voie IM (Herzog et al. 2001). Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence de protéine dans le premier cas : après transfert de gène cette protéine est reconnue comme hétérologue.

Compte-tenu de l'hétérogénéité des cas décrits, la réponse immune dirigée contre la capsid et/ou le produit du transgène semble difficilement prédictive. Par ailleurs, la réponse humorale n'est pas la seule décrite. En effet, elle peut s'accompagner, dans certains cas, d'une réponse cellulaire médiée par les LT et dirigée contre la capsid du vecteur et/ou contre le produit du transgène.

### c) Réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T

De manière schématique, deux types de réponses sont médiées par les LT : la réponse effectrice et la réponse régulatrice. Il existe deux types de réponses effectrices faisant intervenir les LT CD8 ou les LT CD4. Contrairement à la réponse médiée par les LT CD8, la réponse médiée par les LT CD4 peut donner lieu à différents sous-types de LT qui se distinguent par la nature des cytokines produites et leurs fonctions effectrices. Nous nous intéresserons uniquement aux sous-ensembles Th1, Th2 et T régulateurs (Treg).

#### (1) Généralités sur la réponse cellulaire

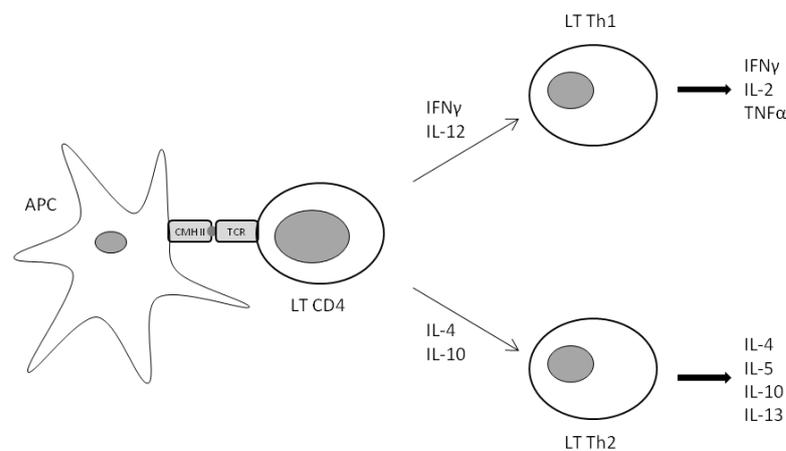
Les LT CD8 sont à l'origine de la réponse cellulaire cytotoxique. Les LT CD8 reconnaissent les complexes CMH I-peptide exprimés à la surface des cellules infectées par un virus. La reconnaissance induit une activation de LT CD8 qui va se différencier en cellules effectrices : les CTL (lymphocyte T cytotoxique) qui établissent alors un contact avec les cellules infectées. De la perforine est relarguée dans l'espace intramembranaire et va perméabiliser la membrane de la cellule. Les granzymes sont alors relargués, pénètrent dans la cellule, gagnent le noyau et déclenchent l'apoptose. En plus de la cytolysse, les CTL produisent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha).

A la différence des LT CD8, les LT CD4 se différencient en différents sous-ensembles qui se distinguent par le type de cytokines sécrétées et leurs fonctions effectrices. Les LT CD4 peuvent se différencier en deux ensembles majeurs : les Th1 ou Th2 (**Figure 13**). D'autres types de lymphocytes ont émergé : nous ne nous intéresserons ici qu'aux Treg (Bluestone et Abbas 2003). Différents facteurs orientent cette différenciation parmi lesquels l'environnement cytokinique et l'intensité de l'interaction entre le TCR et le CMH semblent jouer un rôle majeur (Edwards et Evavold 2011 ; Boyton et Altmann 2002)

Les LT Th1 se différencient sous l'effet de l'IFN $\gamma$  et de l'IL12 produits lors de la réponse innée et sont activés par l'interaction entre leur TCR et un complexe CMH II-peptide exprimé par une APC. Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IFN $\gamma$  et sont impliqués dans

l'immunité contre des antigènes extracellulaires. Les Th1 interagissent avec les macrophages et sont caractérisés par la sécrétion d'IFN $\gamma$ , d'IL2 et de TNF $\alpha$ .

Les LT Th2 se différencient sous l'effet de l'IL4 et de l'IL10 et de l'engagement de leur TCR. Les LT Th2 produisent entre autres de l'IL4, de l'IL5 et de l'IL13 et jouent un rôle auxiliaire dans la réponse humorale médiée par les LB. En effet, la prolifération des LB dépend de l'IL4 et de l'interaction CD40/CD40L. Les cytokines induites par la réponse Th2 vont entraîner l'inhibition de la réponse Th1 et vice-versa (Abbas, Murphy, et Sher 1996).



**Figure 14 : Différenciation des LT CD4 en lymphocytes T-helper.** Les DC activées interagissent avec les LT naïfs. En présence d'IFN $\gamma$  et d'IL2, les LT CD4 vont plutôt s'orienter vers une réponse de type Th1 caractérisée par la sécrétion d'IFN $\gamma$ , d'IL2 et de TNF $\alpha$ . En présence d'IL-4 et d'IL10, les LT CD4 vont plutôt s'orienter vers une réponse de type Th2 caractérisée par la sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL10 ou encore d'IL-13.

Enfin, les LT CD4 peuvent aussi se différencier en Treg qui ont une activité suppressive sur la réponse immunitaire et préviennent l'auto-immunité. Les Treg naturels (nTreg) se différencient dans le thymus et expriment de manière constitutive le récepteur à l'IL2 : le CD25. Le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3) est également exprimé de manière stable dans les nTreg et est requis pour l'activité suppressive de ces cellules. Les Treg dit induits (iTreg) se développent non pas dans le thymus mais en périphérie à partir de LT CD4 naïfs et sous l'action du TGF- $\beta$ . Les Treg produisent de forte quantité d'IL-10 et de TGF- $\beta$  qui vont avoir un effet suppresseur sur les LT effecteurs (Vignali, Collison, et Workman 2008).

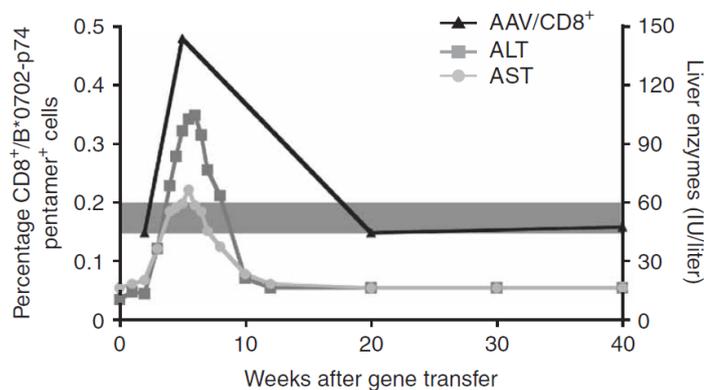
Tout comme les LB, les LT donnent lieu à des cellules mémoires séparées en deux groupes : les LT de la mémoire centrale ( $T_{CM}$ ) et des LT effecteurs mémoires ( $T_{EM}$ ). Ces deux sous-types se différencient par les marqueurs qu'ils expriment mais également par les cytokines qu'ils sécrètent (Okada et al. 2008). Chez l'Homme, les  $T_{CM}$  expriment les marqueurs CD45RO, CD62L et CCR7. Ils sont retrouvés dans les tissus lymphoïdes et ont la propriété de se diviser rapidement et de se différencier en cellules effectrices en réponse à un antigène. Les  $T_{EM}$ , quant à eux, expriment le CD45RO mais pas CD62L ni CCR7. Ils circulent dans les tissus périphériques et ont une capacité proliférative limitée mais une fonction effectrice prononcée (Tanel et al. 2009).

Nous avons vu précédemment que la réponse immune humorale contre la capsidite et contre le produit du transgène a longtemps été la seule réponse mesurée pour expliquer pourquoi le transfert de gène était inefficace. Plus récemment, la translation de protocoles précliniques chez l'Homme a révélé la présence d'une réponse immune cellulaire dirigée contre la capsidite de l'AAV.

## ***(2) Réponse cellulaire dirigée contre la capsidite de l'AAVr***

Ce phénomène a été décrit pour la première fois dans un essai clinique chez des patients hémophiles. La preuve de concept pour ce protocole de thérapie génique avait été faite dans des modèles de souris et chiens déficients en FIX (Snyder et al. 1999 ; Mount et al. 2002). Une injection par voie intraportale d'un AAV2r codant pour le FIX permettait une expression de la protéine à long terme et à un taux thérapeutique. L'injection d'AAVr par voie intraportale a donc été amenée en clinique. Mais contrairement à ce qui a été observé chez la souris et le chien, le transfert de gène par voie hépatique a abouti à une expression transitoire du FIX chez l'Homme (Manno et al. 2006). Cette expression transitoire ne corrélait pourtant pas avec une réponse humorale neutralisante dirigée contre le FIX. Par contre, la perte d'expression de transgène s'accompagnait d'une augmentation asymptotique transitoire et réversible des transaminases, signe d'une cytolysé hépatique. Cette observation

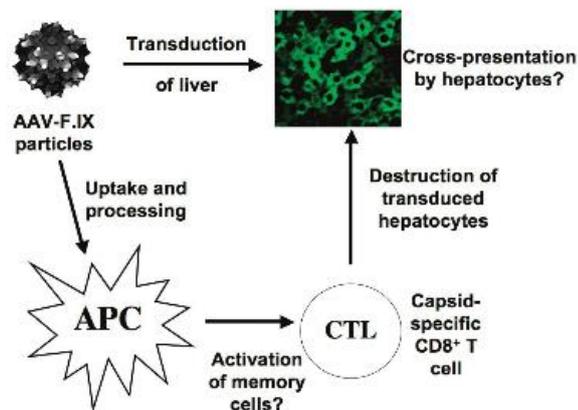
était associée à la détection d'une sécrétion IFN $\gamma$  par les PBMC (peripheral blood mononuclear cell) contre la capsid de l'AAV2 entre quatre et six semaines post-injection (**Figure 15**). L'hypothèse avancée était que ces résultats obtenus chez l'Homme et non dans les modèles animaux pouvaient être dus au fait que l'Homme est un hôte naturel de l'AAV2. Pourtant, ce phénomène n'a jamais été observé chez le primate, également hôte naturel de l'AAV. Dans cet essai clinique, ces patients montraient la présence de LT CD8 cytotoxiques mémoires spécifiques de la capsid dans les PBMC. Suite au transfert de gène, ces LT auraient été réactivés et auraient détruit les hépatocytes transduits exprimant le transgène d'intérêt (Mingozzi et al. 2007a) (**Figure 16**). De plus, les hépatocytes joueraient un rôle de cellules présentatrices dans ce contexte (Pien et al. 2009).



**Figure 15 : Dosage des transaminases sériques et fréquence des LT CD8 spécifiques de l'AAV2 après transfert de gène à l'aide d'AAV recombinant.** L'augmentation de la fréquence des LT CD8 corrèlent avec l'augmentation de transaminases dans le sérum. *Extrait de Mingozzi et al. 2007a*

Cette hypothèse a été vérifiée grâce à une analyse plus poussée de la réponse immune à l'aide de pentamères de molécules de CMH chargées avec le peptide immunodominant de l'AAV2 identifié et commun aux AAV de sérotype 1, 6, 7 et 8 (Mingozzi et al. 2007a). Le but était d'analyser la fréquence de LT spécifiques de la capsid au cours du temps. L'augmentation de la fréquence a été observée en même temps que l'augmentation transitoire des transaminases (**Figure 15**). Pour évaluer la prévalence des LT spécifiques de la capsid de l'AAV2, les PBMC de 46 individus positifs en facteurs neutralisants contre l'AAV2 ont été analysés et seulement deux sont sortis positifs après une analyse directe *ex vivo*. Une méthode d'expansion *in vitro* des cellules a permis de mettre en évidence un plus grand nombre de

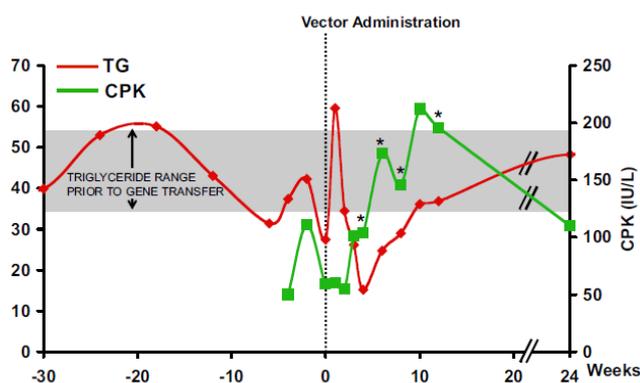
patients présentant une population lymphocytaire répondant à l'AAV et un phénotype mémoire. Ces résultats suggèrent qu'il n'existe peut être pas de corrélation entre la présence de facteurs neutralisants et la présence d'une réponse cellulaire. De plus, les analyses *ex vivo* à partir de PBMC montrent que la fréquence en LT spécifiques de la capside est rare et que l'absence de détection peut provenir de la limite de sensibilité des tests cellulaires (Mingozzi et High 2007). Cette étude a soulevé plusieurs questions pour les essais cliniques à suivre : faut-il screener les patients avant injection ou faut-il leur administrer un traitement immunosuppresseur transitoire mais préventif ?



**Figure 16 : Modélisation des mécanismes responsables de la destruction des hépatocytes transduits par le système immunitaire.** L'AAV est pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes, cela entraîne une activation de LT CD8 spécifiques de la capside, peut-être des LT mémoires. Ces LT CD8 vont ensuite cibler les hépatocytes transduits. Les hépatocytes sont capables de *cross*-présenter les peptides dérivés de la capside après leur dégradation par le protéasome, ces cellules deviennent alors des cibles pour les LT CD8. *Extrait de R W Herzog 2007*

Au-delà de cet essai clinique, la présence d'une réponse lymphocytaire spécifique de la capside de l'AAV a été décrite dans d'autres essais chez l'Homme. Une réponse  $IFN\gamma$  dirigée contre l'AAV1 cette fois a été décrite dans un essai clinique visant à traiter des patients atteints de déficit en LPL (Mingozzi et al. 2009). Cette réponse semblait être dose-dépendante puisque les patients injectés avec la forte dose de  $3 \times 10^{11}$  vg/kg avait une réponse  $IFN\gamma$  qui apparaissait plus précocement que les patients injectés avec  $1 \times 10^{11}$  vg/kg. Chez un patient, l'apparition de cette réponse était même corrélée à une augmentation transitoire de créatine kinase dans le sérum et rappelle ce qui avait été observé chez les patients hémophiles avec l'augmentation des transaminases corrélée à la réponse anti-AAV2. L'analyse de la

réponse a montré que ce patient présentait bien une réponse cellulaire vis-à-vis de l'AAV1 qui résultait en la perte d'expression du transgène thérapeutique (**Figure 17**). Cette réponse cellulaire était accompagnée d'une réponse humorale contre la capside. L'initiation d'une réponse cellulaire et humorale contre la capside de l'AAV1r a également été décrite chez des patients présentant un déficit en AAT. Mais contrairement à l'essai ciblant le déficit en LPL, cette réponse immune envers la capside ne s'est pas accompagnée d'une perte d'expression du transgène (Flotte et al. 2011). Ce phénomène non délétère vis-à-vis du produit du transgène pourrait s'expliquer par la présence d'une tolérance vis-à-vis de la capside. En effet, cette équipe a décrit la présence de capsides virales dans le muscle injecté en plus d'une infiltration de Treg à un an post-injection (Mueller et al. 2013).



**Figure 17 : Représentation du niveau en triglycérides et créatine kinase avant et après injection chez un patient traité par voie intramusculaire avec un AAV1-LPL.** Le niveau en triglycérides est exprimé en millimoles par litre (mmol/L) et le niveau en créatine kinase en unité internationale par litre (IU/L). Les étoiles représentent les points de cinétique où les ELISpot IFN $\gamma$  anti-AAV1 sont positifs. *Extrait de Mingozi et al. 2009*

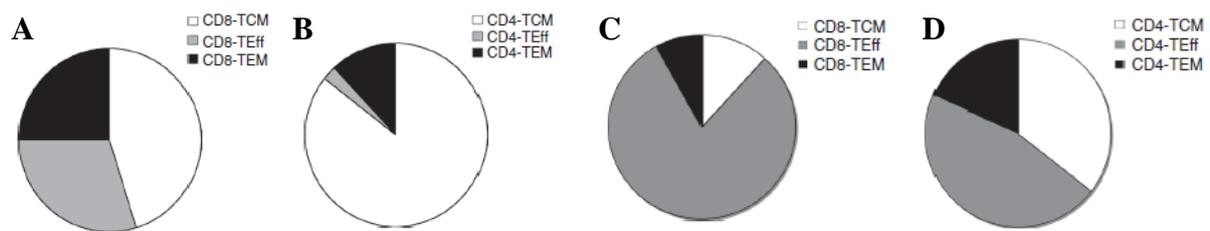
Dans plusieurs études, la question du screening de patients pour les facteurs neutralisants et une éventuelle réponse cellulaire dirigée contre la capside a été soulevée. C'est pourquoi, la prévalence des cellules spécifiques de la capside a été évaluée chez l'Homme pour les sérotypes 1 et 2 mais également chez le primate pour l'AAV de sérotype 8 (Veron et al. 2012 ; Li, Lasaro, et al. 2011).

L'étude de la prévalence de cellules T spécifiques de l'AAV1 a montré que 30% des donneurs analysés ont une réponse pré-existante et la plupart présente une réponse médiée par les LT CD8 qui sécrètent de l'IFN $\gamma$ . Cette analyse a été mise en relation avec les études faites

sur la séroprévalence vis-à-vis de l'AAV. La population est positive à 60% pour l'AAV2 contre 50% pour l'AAV1 (Veron et al. 2012). Cela suggère que soit i) il n'existe pas de corrélation entre la présence de facteurs neutralisants et une réponse cellulaire comme cela avait auparavant été évoqué (Mingozzi et al. 2007a) soit ii) la fréquence de ces cellules est tellement faible que les tests cellulaires actuellement utilisés (ELISpot (enzyme-linked immunosorbent assay), marquages cytokiniques intracellulaires) ne permettent pas toujours de les détecter. En effet, la plupart des individus présentant une réponse cellulaire préexistante vis-à-vis de l'AAV1 était séropositif en facteurs neutralisants alors que l'inverse n'est pas vrai. Cela soulève, encore une fois, la question de savoir s'il faut systématiquement analyser la réponse pré-existante anti-AAV à l'échelle des facteurs neutralisants et des LT pour tous les patients à inclure dans des protocoles de thérapie génique. Cela montre aussi la nécessité de développer des outils de détection de la réponse cellulaire plus sensibles et ne nécessitant pas d'expansion non-spécifique préalable des LT.

L'immunité pré-existante a été caractérisée plus en détails en analysant les différents types de cellules concernées : les LT effecteur ( $T_{EFF}$ ), les  $T_{CM}$  et les  $T_{EM}$  chez l'Homme mais également chez le primate. Dans la population humaine, il a été montré que les LT CD8 préexistants spécifiques de l'AAV2 sont répartis entre les trois populations  $T_{EFF}$ ,  $T_{CM}$  et  $T_{EM}$  alors que les LT CD4 sont majoritairement des  $T_{CM}$  (**Figure 17 A-B**). Ces deux populations totales expriment majoritairement de l'IL2 et de l'IFN $\gamma$  puis du TNF $\alpha$ . Pour ce qui est des primates, les LT CD8 et les LT CD4 préexistants spécifiques de l'AAV8 sont majoritairement des  $T_{EFF}$  (**Figure 17 C-D**). Ces deux populations expriment presque exclusivement de l'IL2.

Ces résultats suggèrent que lors de la réexposition à un AAV chez l'Homme, les LT mémoires sécrètent de l'IFN $\gamma$ , médiateur d'une réponse cytotoxique. Les LT de primate sécrètent quant à eux principalement de l'IL2. Cette différence entre les deux espèces pourrait être une piste pour expliquer pourquoi les LT sont réactivés chez l'Homme après transfert de gène et pas chez le primate. Cependant, ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus chez des souris immunisées qui, bien qu'elles expriment de l'IFN $\gamma$  par l'intermédiaire des LT CD8, n'induisent pas de réponse délétère vis-à-vis des cellules transduites. L'espèce apparaît donc comme une barrière pour la modélisation.



**Figure 18: Proportion de LT CD4 et CD8 répondant à la capsid de l'AAV2 chez l'Homme et AAV8 chez le primate.** Différentes populations de LT CD8 (A) et LT CD4 (B) répondant à capsid de l'AAV2 chez l'Homme. Différentes populations de LT CD8 (C) et LT CD4 (D) répondant à capsid de l'AAV8 chez le primate. TCM = LT de la mémoire centrale ; TEff = LT effecteur ; TEM = LT effecteur mémoire. *Extrait de Hua Li, Lasaro, et al. 2011*

Ces études, couplées à celles concernant la prévalence en facteurs neutralisants, révèlent que la prévalence aussi bien en facteurs neutralisants qu'en LT est élevée chez les individus. Il paraît donc nécessaire de développer des stratégies pour s'affranchir de ces réponses. L'administration transitoire d'immunosuppresseurs a donc été privilégiée. Cependant, la durée du traitement va directement dépendre de la durée de clairance de la capsid après injection. C'est pourquoi, malgré les limites liées à ce modèle, différents modèles de souris ont été développés pour mimer le phénomène observé chez l'Homme et ainsi comprendre les mécanismes impliqués dans la reconnaissance du vecteur par le système immunitaire de l'hôte. Ces études ont également permis de déterminer la durée de clairance de la capsid.

Comme il n'existe pas d'immunité pré-existante contre l'AAV chez la souris, ces dernières ont été immunisées à l'aide d'adénovirus exprimant un antigène de l'AAV2 ou de l'AAV8. Ces souris, ayant développé des LT CD8 sécrétant de l'IFN $\gamma$  spécifiques d'un peptide commun à la capsid de l'AAV2 et AAV8, ont ensuite été injectées avec un AAV codant pour le FIX. Le fait d'avoir préalablement immunisé ces souris n'entraîne pas de perte de l'expression du FIX ni d'augmentation de transaminases contrairement à ce qui a été décrit chez l'Homme. Par ailleurs, une étape de déplétion des Treg par l'injection d'un anticorps anti-CD25 n'a pas eu d'impact sur la réponse cytotoxique (Li et al. 2007), et ce, peut-être car la déplétion en Treg n'était pas complète. Ces résultats suggèrent que la capsid ne serait pas prise en charge de la même façon d'une espèce à l'autre.

Concernant ce point, une équipe est tout de même parvenue à développer un modèle murin capable de mimer la destruction des hépatocytes suite à la réponse anti-capsid comme

cela est observé chez l'Homme (Martino et al. 2013). Les résultats suggèrent que la capsid e serait en partie dégradée par le protéasome. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib semble avoir un impact sur la dégradation de la capsid e (Li et al. 2013 ; Martino et al. 2013). La modification de motifs sur la capsid e du vecteur pour échapper au protéasome pourrait alors augmenter l'efficacité de transduction du vecteur tout en réduisant la présentation des antigènes par les hépatocytes. C'est d'ailleurs ce qui est observé au moins dans un modèle de souris Rag<sup>-/-</sup> qui ne présentent pas de LB ou de LT matures (Martino et al. 2013).

Cette dernière étude met également en évidence le fait qu'entre les sérotypes, la dégradation de la capsid e peut être décalée dans le temps : l'AAV2 serait pris en charge plus rapidement que l'AAV8. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus pour l'AAV2r par le groupe de H Ertl (Li, Tuyishime, et al. 2011). En effet, leur étude réalisée chez la souris a consisté à réaliser un transfert adoptif de LT CD8. Ces cellules, provenant de souris immunisées contre un peptide de l'AAV2 à l'aide d'un adénovirus, ont été injectées à des souris ayant reçu elles-mêmes un vecteur AAV2. Les résultats montrent que ces cellules sont capables de proliférer en réponse à l'AAVr si elles sont injectées jusqu'à six semaines post-administration du vecteur. Cela suggère qu'à six semaines, il n'y a plus un niveau suffisant d'épitopes dérivés de la capsid e de l'AAV pour induire une réponse LT CD8. Par ailleurs, cette même étude réalisée avec une capsid e modifiée enrichie en peptide immunogénique dérivé de l'ovalbumine a montré que les LT CD8 ne prolifèrent plus après dix semaines post-injection. Ces résultats rejoignent donc ceux obtenus par Martino *et al.* et suggèrent que la dégradation de la capsid e et sa clairance dépend du sérotype. De plus, ces études suggèrent qu'une immunosuppression d'au moins dix semaines serait nécessaire pour éviter une réponse contre la capsid e de l'AAV.

En plus de la dégradation de la capsid e par le protéasome, le site de liaison de l'AAV à la cellule peut jouer un rôle dans l'initiation de la réponse cellulaire. Nous avons vu qu'en fonction du sérotype, les récepteurs et les co-récepteurs nécessaires à l'entrée dans la cellule sont différents. Pour l'AAV2, il semblerait que ce soit son site de liaison à l'héparine qui soit à l'origine de la réponse cellulaire anti-capsid e (Vandenberghe et al. 2006). En effet, la modification de ce site de liaison entraîne une diminution de la réponse cellulaire contre l'AAV2r chez la souris. L'hypothèse évoquée serait que la diminution de la réponse cellulaire est due à la baisse de capacité des AAV à entrer dans les DC. Les capsides de l'AAV8 et

l'AAV7 ne semblent pas se lier à ce motif pour entrée dans la cellule et pourrait expliquer leur caractère moins immunogène. Cette idée est renforcée par le fait que si la capsid de l'AAV8 est modifiée pour qu'elle présente un site de liaison à l'héparine, le vecteur est capable d'induire une réponse cellulaire chez la souris et donc peut-être de se lier aux DC. Le sérotype utilisé semble donc être un facteur important dans l'initiation d'une réponse cellulaire. Cela avait d'ailleurs aussi été décrit dans une étude comparant la réponse immune cellulaire anti-AAV après injection d'AAV2/rh32.33r ou d'AAV8r. L'AAV2/rh32.33 entraînait une réponse immune dirigée contre la capsid plus importante que l'AAV8 chez la souris (Mays et al. 2009).

Enfin, la voie d'administration peut également être un facteur dans l'initiation d'une réponse cellulaire dirigée contre la capsid. En effet, nous avons vu que des réponses immunes dirigées contre la capsid de vecteurs AAV de sérotypes 1, 2 et 8 ont été décrites dans des essais cliniques ciblant le foie ou le muscle. A l'inverse, ce phénomène ne semble pas être une limite dans l'efficacité du transfert de gène dans des essais ciblant les sites dits « immunoprivilégiés » comme l'œil ou le système nerveux central. Pour les maladies de la rétine comme l'Amaurose congénitale de Leber, des patients déficients en RPE65 ayant reçu un vecteur AAV par voie sous-rétinienne ont même été réinjectés dans l'œil controlatéral (Bennett et al. 2012). A la différence des transferts de gène dans le muscle et le foie, de faibles doses de vecteurs étaient injectées et pourraient aussi expliquer l'absence d'une réponse immune.

La réponse dirigée contre la capsid de l'AAV a largement été décrite lors du transfert de protocoles précliniques chez l'Homme. Cependant, comme pour la réponse humorale, la réponse cellulaire peut également être dirigée contre le produit du transgène.

### ***(3) Réponse cellulaire dirigée contre le produit du transgène***

Le principe de la thérapie génique additive est d'amener une copie fonctionnelle du gène défectueux au sein d'une cellule pour faire synthétiser une protéine fonctionnelle.

L'absence de production de la protéine fonctionnelle peut être due à une mutation non-sens ou à une mutation nulle. Dans le cas d'une mutation nulle, ces protéines pourraient donc être reconnues par le système immunitaire et induire une réponse immunitaire destructrice.

Chez l'Homme, la réponse immune cellulaire dirigée contre le produit du transgène a d'abord été décrite dans l'essai ciblant le déficit en AAT (Flotte et al. 2011). Seulement un patient a montré la présence de LT répondant à un peptide dérivé de la séquence codant pour l'AAT. Cette réponse n'a cependant eu aucune conséquence clinique.

Très récemment, une réponse immune dirigée contre la dystrophine a été décrite chez des patients atteints de la DMD et traités par thérapie génique par l'apport d'une minidystrophine (Mendell et al. 2010a). Des LT sécrétant de l'IFN $\gamma$  et spécifiques de la dystrophine ont été détectés aussi bien avant qu'après transfert de gène. Ce phénomène d'immunité pré-existante envers un antigène du soi a été expliqué par la pathologie en elle-même. En effet, dans le cas de la DMD, les patients présentent des délétions dans le gène codant pour la dystrophine. Ces délétions aboutissent à une protéine tronquée. Pourtant, ces patients peuvent présenter des fibres exprimant la dystrophine. Elles sont dénommées fibres révertantes et sont souvent présentes en très faible nombre. Dans cet essai, les patients présentaient quelques fibres révertantes. Il est donc possible que les épitopes envers lesquels réagissent les LT proviennent de la dystrophine exprimée à faible niveau dans les fibres révertantes. Après transfert de gène, ces LT mémoires spécifiques de la dystrophine auraient été réactivés. Depuis cette étude, une autre équipe s'est intéressée à la présence d'une réponse T anti-dystrophine chez des patients atteints de DMD. Cette étude a montré que, en l'absence de tout traitement par thérapie génique, la détection de LT anti-dystrophine augmente avec l'âge mais que ce risque diminue si le patient reçoit un traitement corticoïdien (Flanigan et al. 2013). La réponse peut également varier en fonction des corticoïdes administrés ce qui suggère que tous les patients ne réagissent pas de la même façon au traitement. Enfin, à la différence du transfert de gène à l'aide de vecteurs viraux, le traitement à l'aide d'AON n'induit pas cette réactivation de LT suggérant que les vecteurs viraux peuvent avoir un effet adjuvant et induire un environnement inflammatoire.

Cette même recherche de LT mémoires sécrétant de l'IFN $\gamma$  en réponse à un antigène du soi a été effectuée chez des individus sains ou atteints de mucoviscidose. Étonnamment, cette réponse dirigée contre la protéine CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) a été décrite chez ces deux populations. Le nombre d'individus présentant une

réponse positive était plus important chez les patients atteints de mucoviscidose que chez les patients sains (Calcedo et al. 2013). L'hypothèse proposée est que certains LT issus du thymus ont échappé à la sélection négative et se retrouvent dans la circulation où leur réactivité est contrôlée par les nTreg. Chez les individus sains, la quantité de cellules est trop faible pour être détectée mais par contre chez les individus malades, la réponse est plus forte à cause de l'environnement inflammatoire provoqué par la maladie. Cette étude reste cependant à compléter car i) un seul paramètre a été évalué : la sécrétion d'IFN $\gamma$  et ii) elle n'a pas été réalisée dans un contexte de transfert de gène. On ne sait donc pas si ces cellules ont un effet délétère dans ce contexte.

Comme pour la réponse humorale anti-transgène, plusieurs facteurs peuvent intervenir dans l'initiation de la réponse cellulaire. Ainsi, certains sérotypes sont plus à même de déclencher une réponse immune. C'est le cas de l'AAV2/rh32.33 qui, comparé à l'AAV8 codant pour le même transgène, déclenche une réponse immune médiée par les LT CD8 et dépendante des LT CD4 (Mays et al. 2009). Cette même étude suggère d'ailleurs que, dans un modèle murin, l'AAVr de sérotype 8 induirait une tolérance vis-à-vis du produit du transgène lorsque le vecteur est injecté par voie IM contrairement au vecteur AAV2/rh32.33 (Mays et al. 2013). La tolérance ne serait pas due à la présence de Treg mais plutôt à la faible transduction des DC par l'AAV8r et sa faible capacité à induire une surexpression des CMH I à la surface des myocytes, comme cela est observé avec le vecteur AAV2/rh32.33 ou l'AAV1r dans un autre modèle (Toromanoff et al. 2010).

La voie d'administration joue également un rôle crucial dans le développement de la réponse immune dirigée contre le produit du transgène. Ce paramètre de modulation est apparu tôt puisque dès 1999, une étude chez la souris a montré qu'en fonction de la voie d'administration de l'AAVr, la réponse cytotoxique vis-à-vis du produit du transgène pouvait être plus ou moins forte (Brockstedt et al. 1999). Parmi les voies d'administration, la voie hépatique semble induire un phénomène de tolérance envers le produit du transgène, au moins dans des modèles animaux. En effet, ce phénomène d'induction de la tolérance a, dans un premier temps, été montré chez la souris puis chez le chien (Mingozzi et al. 2003 ; Mount et al. 2002). Des souris injectées par voie intraportale avec un AAV-FIX exprimaient le FIX dès deux semaines et jusqu'à au moins 20 semaines post-injection. Ce maintien de l'expression du transgène a été caractérisé comme de la tolérance vis-à-vis du FIX et non de l'ignorance. En effet, après transfert de gène par voie intraportale, les souris ont été immunisées avec de la

protéine recombinante et n'ont pas répondu contre le FIX. Des expériences de transfert adoptif ont montré que la tolérance pouvait être transférée d'une souris à l'autre et que celle-ci était médiée par les LT CD4. En effet, le transfert adoptif de cellules déplétées en LT CD4 ne conférait pas cet avantage. Cet effet de la voie d'administration sur la réponse anti-transgène a aussi été décrit chez les chiens hémophiles portant une mutation nulle. Alors qu'une administration IM chez ces chiens entraînait un rejet du produit du transgène dû à une réponse neutralisante contre le FIX, l'administration par voie intraportale a permis de s'affranchir de cette réponse dans ce modèle. Bien que le foie soit décrit comme un organe tolérogène, ces résultats observés chez le chien dans un modèle de transfert de gène thérapeutique ne reflètent pas la totalité des essais. En effet, un essai de transfert de gène dans un modèle de primate utilisant la même voie d'administration mais avec cette fois un vecteur AAV codant pour le gène rapporteur de la GFP n'a pas permis d'aboutir à une tolérance envers cette protéine. Une réponse cytotoxique a rapidement été mise en place : environ 30 jours post-administration (G. Gao et al. 2009). Le même phénomène de mémoire vis-à-vis de la capsid observé chez l'Homme aurait pu être la cause de cette réponse délétère envers les cellules transduites mais cette étude n'a pas mis en évidence la présence d'une réponse dirigée contre la capsid de l'AAV. Les mécanismes responsables de la mise en place ou non d'une tolérance après transfert de gène hépatique restent encore mal élucidés.

Les données concernant la réponse immune anti-capsid et anti-transgène montrent que de nombreux facteurs peuvent l'influencer. Si l'on se base sur les données observées chez l'Homme, il en ressort qu'en plus de déterminer si les patients possèdent un titre en facteurs neutralisants anti-AAV élevés, il faudrait également déterminer s'ils présentent une réponse cellulaire pré-existante à la fois contre la capsid de l'AAV et contre le produit du transgène. Les critères d'inclusion dans les essais cliniques deviendraient alors très drastiques et peu de patients pourraient bénéficier d'un traitement. C'est pourquoi l'utilisation de traitement immunosuppresseur de manière transitoire a été privilégiée.

### **3. Modulation de la réponse immune à l'aide de traitements immunosuppresseurs**

Plusieurs protocoles d'immunosuppression ont été testés dans différents modèles de manière à vérifier que le régime immunosuppresseur permettait bien d'éviter le rejet des cellules transduites sans altérer les fonctions du système immunitaire ni l'efficacité de transduction du vecteur AAV.

Les immunosuppresseurs utilisés ont été choisis en regard de ceux utilisés chez des patients recevant des greffes d'organes et qui se sont montrés efficaces pour prévenir le rejet du greffon. La plupart du temps, plusieurs immunosuppresseurs sont associés car ils ne ciblent pas tous les mêmes cellules (LB ou LT) ni les mêmes fonctions (lymphodéplétion ou inhibition d'une voie de signalisation). De manière à valider ces cocktails d'immunosuppresseurs dans le cadre d'un transfert de gène et non plus d'une greffe, des études ont été réalisées dans des modèles de petits et de gros animaux. Parmi les immunosuppresseurs utilisés, on retrouve la ciclosporine A qui a un effet sur la prolifération des LT puisqu'elle inhibe la transcription de l'IL2, le sirolimus (ou rapamycine) qui inhibe l'activation des LT en bloquant la production d'IL2, le mycophénolate mofétil (MMF) qui a un effet sur la prolifération des LT et des LB ou encore le daclizumab qui est dirigé contre le récepteur à l'IL2 : le CD25.

Le choix du cocktail immunosuppresseurs apparaît comme important pour l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'AAVr. En effet, des protocoles mis en place dans des modèles canins de DMD ont montré que l'association ciclosporine A et MMF ne permettait pas, après un traitement transitoire, de maintenir l'expression à long terme du transgène codant pour la microdystrophine humaine (Zejing Wang et al. 2007). Par contre, l'ajout de l'ATG (anti-thymocyte globulin) au cocktail ciclosporine et MMF permettait une expression du transgène après arrêt de l'immunosuppression dans les zones ne présentant pas d'infiltrats lymphocytaires. Ces résultats ont été confirmés dans le même modèle après une injection du vecteur dans plusieurs muscles ; l'expression du transgène était maintenue jusqu'à un an après l'arrêt de l'immunosuppression (Zejing Wang et al. 2012).

L'effet de cocktails d'immunosuppresseurs a été testé pour différentes voies d'administration comme la voie intra-hépatique et la voie IM. Ces deux voies ont été décrites pour aboutir à une inefficacité du transfert de gène si une réponse immune dirigée contre la

capside est initiée. Dans le cas d'une injection par voie hépatique, des études ont montré que le traitement immunosuppresseur n'a aucun effet sur les facteurs neutralisant préexistants. En effet, une première injection par voie IV chez le primate d'un AAV de sérotype 5 sous immunosuppression entraîne la formation de facteurs neutralisants contre la capsid mais pas de réponses cellulaires anti-AAV ni anti-transgène. Par contre, la ré-administration du même sérotype toujours sous immunosuppression ne prévient pas la neutralisation du vecteur (Unzu et al. 2012). Le contraire a été montré lors d'un transfert de gène par voie IM chez la souris. L'immunosuppression permettait de prévenir de formation d'anticorps dirigés contre la capsid permettant ainsi la ré-administration du vecteur (McIntosh et al. 2011).

Le choix du traitement immunosuppresseur peut également avoir un effet négatif sur le transfert de gène. Cela a notamment été montré dans un modèle de primate où le traitement immunosuppresseur constitué de MMF, de sirolimus et de daclizumab a abouti à la perte des Treg induits après transfert de gène par voie intra-hépatique. La perte de la tolérance vis-à-vis du produit du transgène a été expliquée par la présence de daclizumab dans le cocktail immunosuppresseur qui cible le récepteur à l'IL2 : le CD25. En effet, ce récepteur est fortement exprimé à la surface des Treg (Mingozzi et al. 2007b).

Toutes ces études montrent bien la complexité de mettre en place des traitements immunosuppresseurs efficaces et non-délétères. Cependant, elles ont rendu possible le traitement de patients atteints d'un déficit en LPL sous immunosuppression transitoire. Les patients reçoivent un traitement immunosuppresseur pendant 12 semaines qui consiste en une administration de ciclosporine A et de MMF pour prévenir la réponse cellulaire anti-capsid de l'AAV1r précédemment décrite et qui a abouti à l'inefficacité du transfert de gène (Mingozzi et al. 2009). Ce protocole a permis une expression à long terme et une amélioration clinique du désordre métabolique des patients. Ces résultats ont donné lieu au premier médicament de thérapie génique ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché, le Glybera<sup>®</sup> (Gaudet et al. 2013). Un protocole d'immunosuppression a également fait ses preuves dans un essai clinique ciblant des patients atteints d'hémophilie B mais *a posteriori* de l'injection de vecteur. En effet, suite au transfert de gène par voie hépatique, un patient a vu ses transaminases augmenter et l'expression du FIX diminuer. Un bref traitement immunosuppresseur constitué de glucocorticoïdes qui ont un effet sur le facteur de transcription NFκB a permis de rétablir le taux circulant en FIX tout en abaissant le niveau de transaminases. Une observation similaire a été décrite chez deux primates qui avaient

développé des anticorps neutralisants contre le FIX (Mingozzi et al. 2012). Ces deux primates ont reçu un traitement immunosuppresseur transitoire constitué de rituximab et de ciclosporine A. Suite à ce traitement, qui a induit une profonde déplétion en LB sans pour autant affecter les Treg, le FIX a de nouveau été détecté dans le plasma et les anticorps anti-FIX ont diminué pour retomber à un taux basal. Cette étude suggère que, dans ce modèle, une brève immunosuppression permet d'éradiquer la présence d'anticorps contre le produit du transgène *a posteriori*.

Enfin, bien que l'impact de protocoles d'immunosuppression ait été mesuré sur la présence de facteurs neutralisants, une étude s'est intéressée à son effet sur la réponse cellulaire pré-existante anti-AAV. Il semblerait que ce genre de traitement n'influe pas sur ce type de réponse même si en moyenne une tendance à la baisse de LT CD4 spécifiques de la capsid et une tendance à l'augmentation de LT CD8 effecteurs et de la mémoire centrale sont observées chez l'Homme (Parzych et al. 2013).

Malgré ses limites, le traitement immunosuppresseur transitoire semble être aujourd'hui une bonne alternative pour permettre un transfert de gène à long terme. La plupart des protocoles ont établi sa durée en fonction de la durée de clairance de la capsid. Malheureusement, nous n'avons pas encore assez de recul pour affirmer que c'est ce paramètre qui sera déterminant dans la réussite du transfert de gène. Alors que les protocoles d'immunosuppression semblaient être une bonne alternative pour la réponse anti-capsid, des études ont montré que des particules intactes d'AAV pouvaient être retrouvées une à plusieurs années après l'injection. C'est notamment le cas après une administration sous-rétinienne : des capsides de l'AAV2 et de l'AAV5 ont été retrouvées six ans après le transfert de gène dans des rétines de chiens et de primates (Stieger et al. 2009). C'est également le cas après une administration IM chez des patients atteints de déficit en AAT où des capsides ont été retrouvées dans le muscle injecté à un an post-injection (Mueller et al. 2013). Toutes ces observations suggèrent qu'il faut développer d'autres stratégies pour éviter l'initiation d'une réponse immunitaire.

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'AAVr peut varier en fonction du modèle utilisé. Dans certains cas il entraîne une

persistance de l'expression du transgène, dans d'autres cas l'échec du transfert de gène est la plupart du temps lié à une réponse immune dirigée contre la capsidie et/ou le produit de transgène. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme pouvant influencer cette réponse immune : la dose injectée, l'état pathologique du tissu cible, le promoteur ou encore la voie d'administration. Nous nous intéresserons plus particulièrement à ce dernier paramètre qui a fait l'objet de cette thèse.

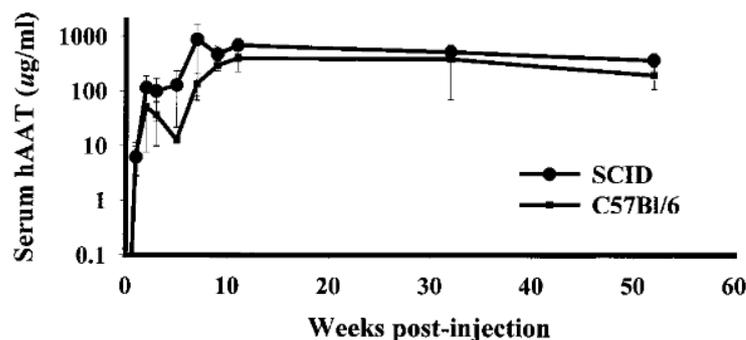
#### ***D. Transfert de gène dans le muscle squelettique à l'aide d'AAV recombinant***

Grâce à son importante vascularisation et à son accessibilité, le muscle squelettique est rapidement apparu comme un tissu de choix pour le transfert de gène à l'aide d'AAVr. De plus, la longue durée de vie des fibres musculaires permet une persistance du génome viral. C'est pourquoi, cibler le muscle squelettique présente bien sûr un intérêt dans le traitement de maladies musculaires mais également dans le traitement de maladies métaboliques. En effet, la transduction des fibres musculaires permet une expression à long terme de facteurs sécrétés comme l'Epo (Kessler et al. 1996). Le muscle squelettique est donc devenu une cible privilégiée pour corriger les déficits en FIX (Hoffman et al. 2007) ou en enzymes comme l'AAT (Song et al. 1998) ou la LPL (Ross et al. 2004).

Pour ces approches, la voie IM a donc été choisie en première intention car elle présente de nombreux avantages : i) elle est non-invasive, ii) elle permettrait une faible dissémination du vecteur (V R Arruda et al. 2001) au moins dans le liquide séminal après une administration d'AAV2r à une dose allant jusqu'à  $1 \times 10^{13}$  vg/kg et iii) l'immunité pré-existante contre l'AAV ne semble pas altérer son efficacité de transduction (Manno et al. 2003). Les deux derniers points n'ont cependant pas été confirmés dans les études ultérieures.

## 1. Transfert de gène par voie intramusculaire

Les premiers essais de transfert de gène par voie IM ont été réalisés dans des modèles murins. Différents transgènes ont été utilisés et ont pu montrer une expression à long terme de la protéine d'intérêt. Dans la plupart des études chez la souris, ce sont des protéines hétérologues qui ont été utilisées. En effet, les premiers essais consistaient à injecter des vecteurs AAV2 codant pour le gène rapporteur LacZ ou pour l'Epo humaine (Snyder et al. 1997). Ces vecteurs ont montré que l'expression du transgène pouvait être détectée à long terme post-injection : jusqu'à huit mois (Kessler et al. 1996) voire un an et demi pour le LacZ (X. Xiao, Li, et Samulski 1996). Après cette preuve de concept avec des transgènes rapporteurs, l'utilisation de gènes thérapeutiques s'est développée. Les premières maladies ciblées par cette voie d'administration étaient l'hémophilie B (R W Herzog et al. 1997) et le déficit en AAT (Song et al. 1998). Ces essais ont montré qu'une seule administration en IM d'un vecteur AAV pouvait permettre une expression à long terme du transgène. En effet, l'expression sérique d'AAT pouvait être maintenue jusqu'à 52 semaines après injection dans des modèles de souris immunocompétentes et immunodéficientes (Song et al. 2001) (**Figure 19**).



**Figure 19 :** Expression à long terme de l' $\alpha_1$ -anti-trypsine humaine (hAAT) dans le muscle squelettique de souris injectées avec un AAV2 par voie intramusculaire. La présence d'AAT est mesurée par ELISA dans le sérum des souris de la semaine 1 à la semaine 11 post-injection. *Extrait de Song et al. 2001*

Les observations faites chez le rongeur ont ensuite été transposées au gros animal comme le chien ou le primate. Le maintien de l'expression à long terme du transgène a été

montré dans le cadre d'une injection par voie IM d'un transgène thérapeutique pour le traitement de chiens hémophiles : le FIX (jusqu'à 17 mois post-injection, R W Herzog et al. 1999) mais aussi avec un gène rapporteur chez le primate : l'Epo (S. Zhou et al. 1998). Au laboratoire, en l'absence de toute réponse immune, le maintien de l'expression du transgène après une administration du vecteur par voie IM a même été observé jusqu'à 10 ans post-injection dans un modèle de primate (données non-publiées).

## **2. Limites liées à la réponse immune**

Alors que dans certains modèles, la voie IM a permis une expression à long terme du transgène, elle s'est souvent révélée immunogène. En effet, cette voie est souvent associée à une réponse immune dirigée contre le produit du transgène, qu'il soit autologue ou hétérologue. Cette réponse a assez peu été observée dans des modèles murins mais a été une des principales limites à l'efficacité du transfert de gènes dans les modèles de gros animaux.

En effet, dans un modèle canin d'hémophilie B, des anticorps dirigés contre le FIX étaient détectés dès la première semaine après l'injection du vecteur (R W Herzog et al. 2001). La réponse immune anti-transgène a également été décrite chez le chat déficient en LPL (Ross et al. 2006) ou chez le primate après injection d'un vecteur codant pour l'Epo de macaque (Favre et al. 2002 ; Chenuaud et al. 2004b ; G. Gao et al. 2004a). Dans ces deux études, le transfert de gène a été inefficace et cela a été en partie expliqué par la présence d'anticorps dirigés contre le produit du transgène. Cette limite n'est cependant pas apparue chez les patients atteints de désordres génétiques. En effet, dans les premiers essais cliniques, les patients inclus exprimaient un taux basal résiduel de la protéine d'intérêt. Cela suggère que le système immunitaire reconnaissait la protéine comme une protéine du soi. D'autres limites ont cependant émergé suite à l'injection du vecteur par voie IM dans ces essais cliniques chez l'Homme.

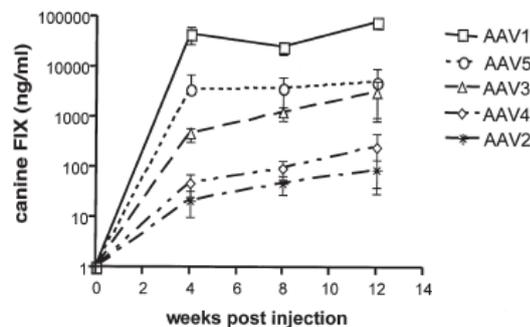
### 3. Limites liées à la voie intramusculaire en clinique

C'est en 1999 que le premier essai clinique chez l'Homme a été réalisé en injectant un AAV2 codant pour le FIX par voie IM. La dose de  $1,8 \times 10^{12}$  vg/kg ne permettait malheureusement pas d'aboutir à un taux thérapeutique de FIX (Kay et al. 2000 ; Manno et al. 2003). D'autres essais cliniques ont suivi comme le traitement de patients atteints d'un déficit en AAT (Brantly et al. 2006). Tout comme le FIX, l'injection du vecteur à une dose maximale de  $6 \times 10^{13}$  vg totaux ne permettait pas d'atteindre un taux thérapeutique de la protéine. Ces résultats ont soulevé deux points : d'une part, que la dose nécessaire pour obtenir un taux thérapeutique est plus faible chez la souris que l'Homme et d'autre part, que le sérotype 2 n'était peut être pas le sérotype le plus performant pour cibler le muscle squelettique.

D'autres sérotypes ont alors été testés pour évaluer leur efficacité dans le muscle. Il s'est avéré que l'AAV1r présentait une meilleure efficacité de transduction dans le muscle que l'AAV2r (W. Xiao et al. 1999; Chenuaud et al. 2004a). Les AAV2r ont également été comparés aux AAV1, 3, 4 et 5 recombinants. Les résultats ont montré que c'était bien l'AAV1r qui était le vecteur le plus performant pour transduire le muscle squelettique *in vivo* (Chao et al. 2000) (**Figure 20**). Le fait que cet AAVr entraîne une meilleure expression du transgène confère deux avantages : une plus faible dose d'AAV1r peut être injectée pour atteindre un niveau d'expression de la protéine comparable à l'AAV2r et si la dose est diminuée, cela a des répercussions directes sur la quantité de préparation virale à produire. Ainsi, l'AAV1r a été testé pour le traitement de l'hémophilie B, dans des modèles murins et canins. Ce sérotype permet, à dose équivalente, de transduire plus de cellules musculaires qu'un AAV2r chez la souris. En comparaison du vecteur AAV2, l'AAV1r permet une expression 10 à 20 fois supérieure de FIX et cette expression est dose-dépendante (Arruda et al. 2004). Par ailleurs, les muscles injectés prélevés à 12 semaines post-injection présentent un plus grand nombre de copies de génomes viraux après injection d'AAV1r que d'AAV2r. Ces résultats ont été confirmés après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV1 codant pour l'AAT dans un modèle murin (Lu et al. 2006) ou codant pour l'Epo dans un modèle de primate (Chenuaud et al. 2004a).

Cependant, comme pour le transfert de gène à l'aide d'AAV2r, l'injection en IM d'AAV1r induit une réponse humorale dirigée contre le produit du transgène dans des modèles animaux (Arruda et al. 2004). L'initiation de cette réponse immune peut être

expliquée par la faible capacité de diffusion de l'AAVr après une injection IM. L'AAV2r a été décrit comme diffusant très peu après injection puisque la transduction des cellules est observée dans un périmètre de 0,5mm au site d'injection (Arruda et al. 2005). Ces résultats ont été confirmés avec l'AAV1r dans une étude de biodistribution du vecteur à l'échelle du génome viral après une injection IM chez le primate (Toromanoff et al. 2008). Ces résultats impliquent que la forte concentration en vecteur à un site donné peut favoriser i) la transduction d'APC, ii) la présentation de peptides dérivés de la protéine exprimée au site d'injection, iii) l'augmentation du nombre de particules virales qui peuvent activer les APC ou encore iv) la concentration d'un composant de la production virale à un site donné qui peut avoir un effet d'adjuvant (Herzog et al. 2002).



**Figure 20 : Concentration en facteur IX (FIX) canin dans le plasma de souris NOD/SCID après injection intramusculaire de sérotypes 1, 2, 3, 4 ou 5 d'AAV recombinants.** Les souris ont reçu  $2,5 \times 10^{11}$  génomes viraux de chaque AAV-FIX dans le gastrocnémien. La concentration en FIX dans le plasma est exprimée en nanogramme par millilitre (ng/mL). *Extrait de Chao et al. 2000*

Du fait des limites imposées par la faible diffusion de l'AAV1 après une injection IM, d'autres sérotypes ont été étudiés. Les vecteurs AAV1 ont été comparés aux vecteurs AAV7 et 8 dans le cadre d'une injection IM chez la souris (Louboutin, Wang, et Wilson 2005). Ces sérotypes ont montré une efficacité de transduction des muscles équivalente à l'AAV1r jusqu'ici décrit comme le sérotype optimal pour le transfert de gène dans le muscle. Depuis, l'AAV8 est apparu comme un sérotype pertinent pour cibler le muscle squelettique. En effet, chez le primate, après une IM, il a été décrit que l'AAV8 avait tendance à diffuser dans le membre : le nombre de copie de génome viral par cellule était plus faible par rapport à un AAV1r mais l'expression du transgène était plus importante (Toromanoff et al. 2008). Par ailleurs, il permettrait, toujours dans le cadre d'une injection IM, une meilleure expression du

transgène, comparé à l'AAV2r, sans pour autant entraîner de réponse humorale contre celui-ci ni de réponse cellulaire contre la capsidite au moins chez la souris (L Wang et al. 2011). Cela n'a cependant pas été vérifié chez le primate où après une injection par voie IM, des anticorps dirigés contre la capsidite de l'AAV8 étaient détectés (Toromanoff et al. 2010). Enfin, l'AAV8r a été décrit comme moins immunogène que les vecteurs AAV de sérotypes 1 et 2 (Vandenberghe et al. 2006 ; Lu et Song 2009 ; Ohshima et al. 2009).

Malgré ses limites, l'AAV1r est encore utilisé dans divers essais cliniques. Il a notamment été injecté chez des patients atteints de déficit en AAT. Cette étude de phase II montre des résultats encourageants puisque l'expression du transgène est maintenue depuis maintenant deux ans. Malgré tout, cette étude avec trois doses différentes montre que même à la plus forte dose ( $6 \times 10^{12}$  vg/kg), le taux thérapeutique est difficilement atteint (Flotte et al. 2011). Par ailleurs, bien que cela n'ait pas eu d'impact sur l'expression du transgène, une réponse humorale et cellulaire vis-à-vis de la capsidite de l'AAV a été détectée chez tous les patients mais également vis-à-vis du produit du transgène chez un des neuf patients injectés.

Un essai clinique ciblant le déficit en LPL a également été initié et a montré une expression locale du transgène mais une perte d'efficacité après 18 à 31 mois post-administration (Stroes et al. 2008). Comme décrit précédemment, la perte d'expression du transgène était liée à l'apparition d'une réponse immune cellulaire dirigée contre la capsidite de l'AAV1 (Mingozzi et al. 2009).

Enfin, plusieurs essais ont été réalisés dans le cadre de myopathies pour traiter les  $\gamma$  ou  $\alpha$ -sarcoglycanopathies par administration d'AAV1r par voie IM (Bartoli et al. 2006 ; Mendell et al. 2010b ; Herson et al. 2012). Ces essais ont montré que le transgène pouvait être exprimé jusqu'à au moins six mois post-injection pour l'essai ciblant la  $\gamma$ -sarcoglycanopathie (Mendell et al. 2010b) et 30 jours pour l'essai  $\alpha$ - sarcoglycanopathie (Herson et al. 2012). L'expression reste cependant très localisée. A la différence des essais permettant la sécrétion de facteurs circulants, le défi est de cibler un maximum de muscles quand il s'agit de traiter des maladies musculaires. C'est pourquoi d'autres méthodes d'injection sont actuellement envisagées pour ces pathologies.

Bien que l'injection IM permette, dans certains cas, une expression à long terme du transgène chez l'Homme, elle présente un certain nombre de limites. En effet, la voie IM

permet rarement d'aboutir à une expression d'un taux thérapeutique du transgène et ne cible en général qu'une zone limitée du membre injecté. Cela pose donc des limites pour le traitement de maladies musculaires. De plus, cette voie d'injection est souvent associée à une réponse immune dirigée contre le produit du transgène dans des modèles de gros animaux. Il apparaît donc nécessaire de trouver des stratégies pour i) cibler un maximum de muscles dans le membre injecté, ii) atteindre des niveaux d'expression de la protéine satisfaisants et iii) empêcher l'initiation d'une réponse immunitaire.

#### **4. Voies alternatives à la voie intramusculaire**

Nous avons vu précédemment que la voie d'administration pouvait jouer un rôle critique dans l'efficacité du transfert de gène et notamment dans l'initiation d'une réponse immune dirigée contre le produit du transgène. C'est pourquoi, des méthodes d'injection alternatives à la voie IM et ciblant les muscles squelettiques ont été développées. Elles consistent à perfuser un membre entier. Cela permet de cibler non pas un muscle donné mais l'ensemble des muscles du membre injecté. Jusqu'ici, ces méthodes d'injection ont montré une meilleure tolérance vis-à-vis du produit du transgène mais également une meilleure efficacité de transduction des muscles.

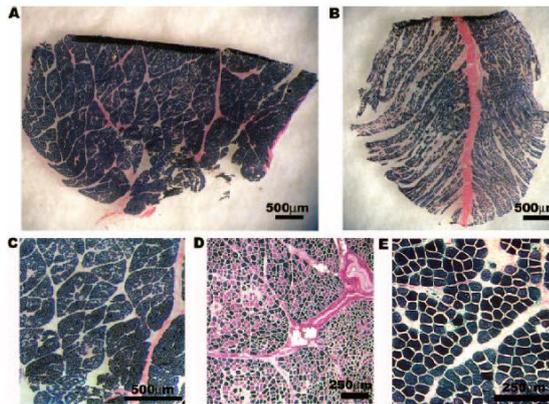
Parmi ces voies d'administration émergentes en transfert de gène, une méthode d'injection a été adaptée de protocoles utilisés en chimiothérapie. Elle consiste à isoler un membre de la circulation à l'aide d'un garrot et de placer deux cathéters : un dans l'artère tibiale antérieure, l'autre au niveau de la veine fémorale. L'injection se fait par drainage veineux suivi d'une perfusion contenant le vecteur à l'aide d'une pompe. Ce protocole a été testé chez des primates et a montré une bonne tolérance à des volumes et pression minimisés. Cette voie d'injection a aussi permis dans ce modèle de maintenir l'expression du transgène jusqu'à au moins 3 mois post-injection (Chicoine et al. Abstract #91, ASGCT 2013). Cette méthode, bien qu'efficace et déjà utilisée dans des protocoles cliniques apparaît comme assez invasive car elle nécessite une approche chirurgicale pour permettre l'abord artériel.

Une autre méthode d'injection passe par l'isolement d'un membre à l'aide d'un garrot, le vecteur est alors injecté par voie intraveineuse ou intra-artérielle. Dans un premier temps, ce mode d'administration était utilisé avec des agents vasodilatateurs pour permettre à

l'AAVr de passer les barrières endothéliales. Dans un modèle de hamster, l'injection par voie intra-artérielle couplée à deux vasodilatateurs (l'histamine et la papavérine) a montré une transduction de l'ensemble des muscles du membre isolé en opposition à la voie IM (Greelish et al. 1999). Ce protocole a alors été transposé chez les gros animaux : chez des chiens sains et chez des chiens hémophiles (Valder R Arruda et al. 2005). Un chien sain a été injecté avec un AAV2-CMV-FIX par voie intravasculaire d'un côté et par voie IM de l'autre. A huit semaines post-injection, alors que le membre injecté par voie intravasculaire montrait une expression du FIX dans les cinq muscles prélevés, l'injection IM ne permettait qu'une expression localisée du transgène au site d'injection. Il est cependant à noter que ces chiens étaient sous immunosuppression transitoire afin d'éviter toute formation de facteurs neutralisants dirigés contre le FIX. Cette méthode qui a montré son efficacité ne pouvait cependant pas être transposée aux patients car l'utilisation de vasodilatateurs tels que l'histamine et la papavérine est déconseillée.

Dans le but d'éviter le traitement nécessaire à la vasodilatation, une autre méthode a été développée et consiste à isoler un membre à l'aide d'un garrot et à injecter le vecteur par voie veineuse cette fois et sous pression (Su et al. 2005). Cette voie, qui a fait l'objet de cette thèse, sera dénommée dans le manuscrit voie intraveineuse locorégionale (LR). Le fait d'injecter le vecteur sous pression va permettre une perméabilisation transitoire de la barrière endothéliale et une diffusion dans le membre entier. Cette méthode a d'abord été appliquée à des rats puis à des chiens et a été bien tolérée : l'injection d'AAV2r-CMV-LacZ a montré une transduction de plusieurs muscles du membre injecté sans altération de leur morphologie (**Figure 21**) (Su et al. 2005). Ce mode d'administration a ensuite été transposé à d'autres modèles : des chiens hémophiles mais aussi des primates. Les données obtenues à partir d'injection de chiens hémophiles, toujours sous immunosuppression, ont montré que l'expression du FIX pouvait être maintenue jusqu'à 4 ans post-injection (Arruda et al. 2010). Cependant, la faible dose ( $1 \times 10^{12}$  vg/kg) ne permettait pas d'atteindre un taux thérapeutique. C'était en revanche le cas à une dose intermédiaire ( $3 \times 10^{12}$  vg/kg), sans pour autant développer de facteurs neutralisants contre le FIX même après arrêt de l'immunosuppression. Par contre, à la dose la plus forte ( $8,5 \times 10^{12}$  vg/kg), même en présence d'immunosuppression, des anticorps contre le FIX étaient détectés. A la dose intermédiaire, deux chiens injectés, sans immunosuppression cette fois, n'ont pas maintenu l'expression du FIX parce qu'ils ont développé des anticorps contre le FIX comme pour le groupe forte dose sous immunosuppression. L'analyse plus poussée de la réponse immune chez ces animaux a mis en

évidence la présence d'anticorps de type IgG2 couplée à une réponse lymphocytaire sécrétant de l'IL-10 et non de l'IFN $\gamma$  envers le FIX (Haurigot et al. 2010). Nous reviendrons plus en détails sur la caractérisation de cette réponse immune dans la section *Contexte et objectifs de la thèse*.



**Figure 21 : Marquage X-gal de muscles de chien injecté avec un AAV-LacZ par voie locorégionale. A-C :** Expression de LacZ dans le gastrocnémien et le vaste latéral (grossissements x5 pour A et B et x10 pour C). **D-E :** Marquage X-gal dans le tibial antérieur et le gastrocnémien (grossissements x40 pour D et x100 pour E). *Extrait de Su et al. 2005*

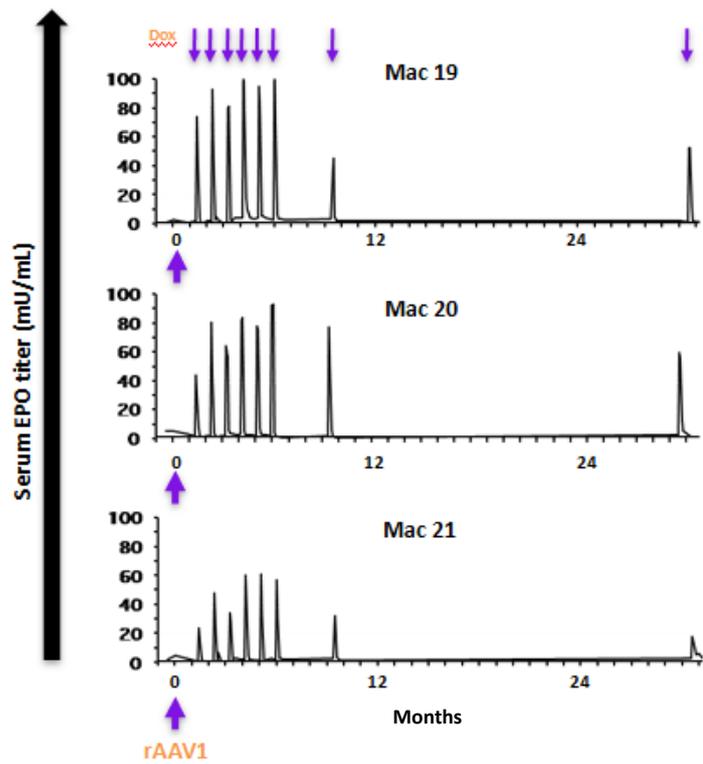
Au laboratoire, cette technique d'injection a été adaptée pour une administration chez le primate, toujours au niveau du membre inférieur. Une première étude a montré que les primates toléraient ce protocole et que cela aboutissait à une transduction de l'ensemble des muscles du membre injecté comparé à la voie IM où la détection se limitait au muscle injecté. L'expression du transgène était également maintenue jusqu'à au moins 20 mois post-injection (Toromanoff et al. 2008). La seconde étude a consisté à injecter un AAV1r-rtTA-Epo par voies IM ou LR toujours dans un modèle de primate. Le système rtTA-Epo est un système inductible à la doxycycline (**Figure 22**). En présence de doxycycline, le rtTA change de conformation et vient se lier au promoteur Tet-On pour initier la transcription du gène de l'Epo. L'Epo est ensuite mesurable de manière indirecte par mesure de l'hématocrite et de manière directe grâce à un dosage sérique par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A la différence des primates injectés par voie IM, ceux injectés par voie LR montraient une persistance de l'expression de l'Epo : le pic de sécrétion d'Epo est toujours détectable entre 7

et 11 mois post-injection et même à plus de 5 ans (Toromanoff et al. 2010 et données non publiées) (Figure 23).



**Figure 22 : Vecteur AAV utilisé dans l'étude de Toromanoff et al, 2010.** Le vecteur code pour l'érythropoïétine de macaque (cmEpo) sous contrôle du promoteur inducible à la doxycycline  $P_{tet^{-1}}$ , le transactivateur rtTA-M2 est sous le contrôle du promoteur desmine, spécifique du muscle. En présence de doxycycline, le rtTA-M2 change de conformation et vient se fixer sur la séquence pour initier la transcription de l'Epo de macaque. ITR, inverted terminal repeat de l'AAV2. *Extrait de Toromanoff et al, 2010*

Les protocoles décrits ici ont montré qu'il était possible de cibler un nombre important de muscles dans un membre isolé à l'aide d'un garrot. Pour que la transduction soit efficace, il faut néanmoins que le vecteur soit injecté avec des agents vasodilatateurs ou sous pression. Dans le cas contraire, l'efficacité de transduction est limitée et n'aboutit pas à une amélioration de la pathologie (Qiao et al. 2009). Par ailleurs, ces voies d'injection semblent permettre une expression à long terme du transgène, sans induire de réponse immune à l'encontre du produit du transgène contrairement à la voie IM. Les mécanismes permettant le maintien de l'expression du transgène à l'aide de cette voie restent encore inconnus. C'est pourquoi cette thèse s'est intéressée aux interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire de l'hôte après transfert de gène dans le muscle à l'aide de la voie LR.



**Figure 23 : Mesure de l'Erythropoïétine dans le sérum de primates après injection par voie locorégionale d'un vecteur AAV1-rtTA/Epo (Figure 22).** Les trois primates ont reçu une dose de  $1 \times 10^{11}$  vg/kg de vecteur. Le titre en érythropoïétine est exprimé en milliunité par millilitre (mU/mL). Chaque induction à la doxycycline entraîne un pic d'expression de l'Epo. *Extrait de Toromanoff et al. 2010 et données non publiées*



## II. Contexte et objectifs de la thèse

### A. Contexte et objectifs

Le laboratoire INSERM 1089 où j'ai effectué ma thèse à Nantes évalue depuis maintenant un peu plus d'une quinzaine d'années l'efficacité de transfert de gène à l'aide des vecteurs AAV dans le muscle squelettique, essentiellement dans un modèle de primate. Les premières études initiées par David Favre et Pierre Chenuaud concernant l'administration par voie IM de ces vecteurs ont montré qu'ils induisaient dans la plupart des cas une réponse immune dirigée contre le produit du transgène (qu'il soit autologue ou hétérologue) chez le primate, contrairement à ce qui avait été décrit dans les modèles murins. En effet, des souris injectées avec un vecteur codant pour l'Epo sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline ont montré qu'il était possible de réguler l'expression de l'Epo jusqu'à 29 semaines après une administration du vecteur par voie IM (Bohl et al. 1998). La transposition de ce modèle chez le primate a montré ses limites. En effet, des primates injectés avec le même type de vecteur codant également pour l'Epo autologue sous contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline (**Figure 22**) pouvaient développer une réponse humorale dirigée contre le transactivateur rtTA nécessaire à l'activation du promoteur  $P_{tet}^{-1}$  (David Favre et al. 2002) ou contre l'Epo endogène elle-même donnant lieu à une anémie auto-immune (Chenuaud et al. 2004b). Ces études montraient également la présence de macrophages et de LT infiltrés dans le muscle injecté.

Comme l'immunogénicité de la voie IM envers le produit du transgène a aussi été montrée dans d'autres modèles de grands animaux, il semblait nécessaire de trouver une alternative. C'est pourquoi, la voie LR, qui consiste en une injection IV sous pression de la préparation virale dans un membre isolé, a été développée dans des modèles de gros animaux. Cette voie s'est avérée plus efficace que la voie IM puisqu'elle permet de transduire efficacement l'ensemble du membre perfusé. De plus, elle semble moins immunogène que la voie IM vis-à-vis du produit du transgène. En effet, le laboratoire a montré que contrairement à la voie IM, la voie LR permet un maintien de l'expression du transgène jusqu'à 5 ans post-injection sans initier de réponse humorale ni de réponse  $IFN\gamma$  médiée par les LT contre le

produit du transgène (Toromanoff et al. 2010 et données non-publiées). Une autre équipe a confirmé ces résultats dans un modèle de chiens hémophiles où l'expression du FIX était maintenue jusqu'à plus de deux ans après l'injection (Arruda et al. 2010). Cette même équipe a montré que la voie LR, couplée à un traitement immunosuppresseur, n'entraînait pas de réponse humorale neutralisante dirigée contre le produit du transgène et a montré l'initiation d'une réponse cellulaire à caractère tolérogénique. En effet, la présence de LT CD4 sécrétant de l'IL10 et exprimant le Foxp3 a été mise en évidence après restimulation de PBMC avec la protéine FIX canine ou un peptide donné du FIX (Haurigot et al. 2010). Cette réponse cellulaire était associée à une réponse humorale de type IgG2 suggérant une réponse T de type Th2 chez ces chiens immunosupprimés.

Ainsi, l'ensemble de ces études montre bien l'avantage de la voie LR sur la voie IM pour transduire de manière efficace et à long terme le muscle, sans pour autant induire de réponse immune délétère vis-à-vis du produit du transgène. Cependant, les mécanismes expliquant le maintien de l'expression du transgène à long terme ou bien son rejet restent encore mal élucidés. Il semble néanmoins que la nature des interactions entre le vecteur et le système immunitaire de l'hôte soit déterminante. C'est pourquoi, cette thèse a eu pour objectif principal de caractériser ces interactions entre le vecteur AAV et les acteurs du système immunitaire après transfert de gène dans le muscle squelettique. Pour cela, ce travail a été divisé en trois parties.

La première partie a consisté à étudier la biodistribution du vecteur dans un modèle murin après une injection par voie IM. Pour cela, la biodistribution du vecteur à l'échelle des tissus cibles et des organes lymphoïdes mais aussi à l'échelle des cellules immunocompétentes a été étudiée. Le but était de déterminer une cinétique de biodistribution du vecteur dans les organes lymphoïdes secondaires, de caractériser les cellules transduites dans ces tissus et de mettre en évidence la transduction d'APC et plus particulièrement de DC *in vivo*, car c'est un sujet encore controversé dans la littérature (Jooss et al. 1998 ; Aldrich et al. 2006 ; Veron et al. 2007 ; Veron et al. 2009 ; Zhu, Huang, et Yang 2009 ; Mays et al. 2013).

Les deuxième et troisième parties avaient pour objectifs de comprendre pourquoi la voie LR se révèle être moins immunogène que la voie IM dans un modèle de primate et si le promoteur a un impact sur l'immunogénicité. Deux promoteurs ont donc été comparés : le promoteur CMV qui est ubiquitaire et le promoteur desmine spécifique du muscle. Dans ce

modèle, l'expression du transgène, la réponse immune vis-à-vis du produit du transgène, les interactions entre le vecteur AAV et les organes lymphoïdes et les cellules immunocompétentes et enfin, l'impact de la voie LR sur l'expression de gènes codant pour des cytokines et chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire ont été étudiés. Tous ces paramètres, évalués chez des primates injectés par voie LR, ont également été étudiés chez un primate injecté par voie IM, utilisé comme référent en terme d'immunogénicité vis-à-vis du produit du transgène.

## ***B. Choix expérimentaux***

### **1. Modèles animaux**

Afin de réaliser mes travaux de thèse, il était primordial d'utiliser des modèles animaux pertinents capables de mimer des phénomènes immunitaires observables chez le patient. En effet, comme nous l'avons vu auparavant, c'est en passant des modèles de petits animaux tels que la souris à des modèles gros animaux tels que le chien, le chat ou encore le primate que les protocoles de transfert de gène ont montré leurs limites d'un point de vue immunologique. Dans cette optique, le macaque nous semblait être un modèle d'étude de choix et tout à fait envisageable grâce au centre de Boisbonne qui héberge des macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) à proximité du laboratoire.

Une étude préliminaire et complémentaire a été réalisée chez des souris C57/Bl6. Elle a consisté à étudier la cinétique de biodistribution du vecteur dans les organes lymphoïdes ainsi que la cinétique d'expression du transgène d'intérêt. En effet, une des hypothèses concernant l'immunogénicité de la voie IM est que l'AAVr interagit avec les organes lymphoïdes et les cellules immunocompétentes. Le modèle murin nous permettait de déterminer si le vecteur était détecté dans ces organes et à quel moment, mais aussi de caractériser le type de cellules qui y sont transduites avec un intérêt particulier pour les APC et les DC. Il est cependant à noter que cette étude a été réalisée en faisant abstraction de la problématique concernant le rejet du transgène puisqu'elle n'est pas critique dans les modèles de rongeurs.

## 2. Choix du vecteur et dose injectée

Nous avons pu voir que le sérotype du vecteur pouvait avoir un impact sur la réponse immune. En effet, la séroprévalence et le tropisme du vecteur varient selon le sérotype d'AAV. Suite aux études cliniques qui ont été initiées pour le traitement de maladies métaboliques, l'AAV2r et l'AAV1r n'apparaissent plus comme les sérotypes privilégiés pour le transfert de gène dans le muscle squelettique. En effet, l'AAV2 montre la séroprévalence la plus importante chez l'Homme quelle que soit la région du monde. L'AAV1, quant à lui, a une séroprévalence plus faible et présente un tropisme très efficace dans le muscle squelettique. Cependant, sa faible diffusion en dehors du site d'injection lui confère une inefficacité du transfert de gène à distance ainsi qu'une immunogénicité plus importante pouvant aboutir à une inefficacité du transfert de gène (Arruda et al. 2005 ; Toromanoff et al. 2008). Nous avons donc choisi d'utiliser un sérotype émergent et prometteur : le sérotype 8. En effet, il présente un bon tropisme pour le muscle squelettique (Zincarelli et al. 2008) mais également pour le foie (Zhong Wang et al. 2005), organe décrit comme pouvant induire une tolérance dans le cadre d'un transfert de gène (Mingozzi et al. 2003). Par ailleurs, il présente une séroprévalence beaucoup plus faible que l'AAV1 ou l'AAV2 chez l'Homme, limitant ainsi le risque de neutralisation de l'AAV après injection. Ce sérotype est d'ailleurs actuellement utilisé dans un essai clinique ciblant les patients atteints d'hémophilie B (Nathwani et al. 2011). Il sera également utilisé dans un prochain essai clinique par le groupe AFM-Téléthon d'ici 2015. Cet essai vise à traiter la myopathie de Duchenne par une stratégie de saut d'exon après une administration par voie LR du vecteur thérapeutique.

Dans le but de vérifier si la voie LR est une voie permettant une expression à long terme du transgène quel qu'il soit, nous avons fait le choix d'utiliser un vecteur scAAV plutôt qu'un ssAAV et ce, pour deux raisons : i) la synthèse du second brin d'ADN peut être une étape limitante dans l'efficacité d'expression du transgène dans certains types cellulaires telles que les DC (Veron et al. 2009 ; Aldrich et al. 2006) et ii) ce type de vecteur est décrit comme plus immunogène que les vecteurs ss (Martino et al. 2011 ; T. Wu et al. 2011).

Concernant la dose injectée, nous avons souhaité nous placer dans des conditions proches de ce qui est réalisé dans les études précliniques et cliniques, de manière à augmenter la pertinence de nos travaux. Dans la plupart des essais cliniques, des doses croissantes en vecteur sont injectées de manière à déterminer la dose minimale pour obtenir un effet

thérapeutique. Ces doses se situent entre  $1 \times 10^{11}$  et  $2 \times 10^{12}$  vg/kg pour des administrations par voie IM (Flotte et al. 2011 ; Brantly et al. 2009 ; Gaudet et al. 2013) ou par voie hépatique (Manno et al. 2006 ; Nathwani et al. 2011). Plus récemment, et dans le cadre de la préparation de l'essai clinique pour traiter la DMD, la dose thérapeutique a été définie autour de  $2,5 \times 10^{13}$  vg/kg au cours de l'étude préclinique dans un modèle de chiens dystrophiques GRMD (Le Guiner et al, manuscrit en préparation).

Ainsi, dans l'étude de biodistribution du vecteur dans un modèle murin, les souris ont été injectées avec une dose de  $2 \times 10^{11}$  vg totaux, correspondant à environ  $1 \times 10^{13}$  vg/kg. Dans l'étude comparant l'immunogénicité de la voie LR à la voie IM, les primates ont reçu une dose de  $7 \times 10^{12}$  vg/kg.

### **3. Choix du promoteur et du transgène**

Pour le transfert de gène, deux types de promoteur ont été utilisés : un promoteur ubiquitaire et un promoteur spécifique d'un tissu. Dans la plupart des études, ce sont les promoteurs spécifiques de tissus qui ont été privilégiés notamment pour éviter d'une part une expression ectopique du transgène et d'autre part une expression dans les APC pouvant favoriser l'initiation d'une réponse immune. En effet, quelques études montrent que la présence d'un promoteur spécifique du muscle, après une injection IM, permet de diminuer la réponse immune dans des modèles murins (Wang et al. 2005 ; Fougousse et al. 2007). Dans notre cas, nous avons utilisé ces deux types de promoteurs. Un promoteur ubiquitaire a été utilisé pour l'étude chez la souris : le promoteur CMV. Ce promoteur a souvent été utilisé dans des protocoles de transfert de gène à l'aide d'AAV (Miyoshi et al. 1997 ; Sullivan et al. 1997 ; Kay et al. 2000 ; Manno et al. 2003). Dans l'étude chez le primate, en plus de la voie d'administration nous avons voulu mesurer l'impact du promoteur sur la réponse immune dans le but notamment de vérifier si même en présence d'un promoteur ubiquitaire la voie LR reste faiblement immunogène. C'est pourquoi nous avons comparé le promoteur CMV et le promoteur desmine spécifique du muscle, et déjà décrit dans plusieurs études ciblant ce tissu (Bartoli et al. 2006 ; Pacak et al. 2008 ; Rodino-Klapac et al. 2008 ; Talbot et al. 2010). C'est également ce promoteur qui a été précédemment utilisé au laboratoire (Toromanoff et al. 2010).

De manière à étudier les interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire, nous avons besoin d'un transgène dont l'expression est facilement détectable dans les tissus et les cellules d'intérêt. Nous avons donc opté pour un gène rapporteur plutôt qu'un transgène thérapeutique. Le gène rapporteur doit présenter plusieurs propriétés : i) il doit être étranger au génome de manière à le différencier facilement des protéines endogènes, ii) il doit être facilement détectable afin de déterminer dans quels tissus il est exprimé et iii) il doit être quantifiable.

Plusieurs gènes rapporteurs sont utilisés dans les protocoles de thérapie génique : le LacZ qui code pour la  $\beta$ -galactosidase, la luciférase ou encore la GFP. Nous avons choisi de travailler avec la GFP car d'une part sa séquence nucléotidique est suffisamment courte pour entrer dans un vecteur scAAV et d'autre part, sa fluorescence permettra d'analyser par microscopie à fluorescence ou confocale sa présence dans les tissus mais également de visualiser les cellules transduites tout en les caractérisant par cytométrie en flux. Par ailleurs, cette protéine est connue pour être immunogène dans certains modèles de souris (Skelton, Satake, et Kohn 2001) mais également dans des modèles de gros animaux comme le primate (Wang et al. 2010). Son utilisation devrait également nous permettre de conclure quant à la capacité de la voie LR à induire une expression à long terme d'un transgène quel qu'il soit.

# III. Résultats

## ***A. Etude de la biodistribution du vecteur dans les organes lymphoïdes après injection IM d'un AAV8r dans un modèle murin.***

### **1. Contexte de l'étude**

Le déclenchement de la réponse immune après une administration par voie IM a été en partie attribué au fait que cette voie entraînait une concentration de vecteur au site d'injection notamment avec l'AAVr de sérotype 1 (Arruda et al. 2005 ; Toromanoff et al. 2010). Cela peut avoir plusieurs conséquences sur l'initiation d'une réponse immune. D'une part, le vecteur viral peut être drainé de manière importante dans les organes lymphoïdes favorisant ainsi les interactions avec les cellules de l'immunité. D'autre part, il peut transduire directement les APC telles que les DC *in situ*. Ces cellules transduites *in situ* ou dans l'organe lymphoïde le plus proche peuvent alors présenter aux lymphocytes un antigène à leur surface par l'intermédiaire des molécules du CMH. Des antigènes provenant de corps apoptotiques, de cellules en nécrose ou encore de cellules transduites par le vecteur AAV peuvent également être captés par des APC et une fois chargés sur une molécule du CMH, présentés aux lymphocytes. C'est cette deuxième hypothèse qui est favorisée car il a longtemps été admis que les vecteurs AAV étaient incapables de transduire les DC (Jooss et al. 1998). Cependant, des tests de transduction *in vitro* de DC dérivées de monocytes humains ou murins montrent que les AAV de sérotype 1, 2, 5 et 6 en seraient capables (Aldrich et al. 2006 ; Veron et al. 2007 ; Veron et al. 2009). Peu de choses sont décrites pour le sérotype 8. Une étude récente a montré que l'AAV8 transduirait peu ou pas les DC murines, ce qui rendrait ce sérotype peu immunogène (Mays et al. 2013). D'un autre côté, des études montrent l'implication du TLR9 dans le déclenchement de la réponse immune contre l'AAV. Ce récepteur est notamment exprimé à la surface des endosomes dans les DC (Ketloy et al. 2008) suggérant, indirectement, que ces cellules seraient transduites *in vivo* (Zhu, Huang, et Yang 2009). Au final, toutes ces observations soulignent l'importance des interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire de l'hôte dans l'initiation d'une réponse immune bien

que la transduction de cellules immunitaires n'ait pas été démontrée de manière directe *in vivo*.

Notre objectif ici a été de documenter les interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire de l'hôte après une injection par voie IM, en caractérisant les cellules immunitaires transduites *in vivo* avec un intérêt particulier pour les DC. Le sérotype 8 nous a paru pertinent pour ses perspectives cliniques à court terme et parce que sa capacité à transduire des DC reste encore assez peu étudiée *in vivo* contrairement aux sérotypes 1 et 2. Pour cela, nous avons injecté des souris avec un vecteur scAAV8 codant pour la GFP sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire : le promoteur CMV.

Dans ce modèle, nous avons étudié i) la biodistribution du vecteur dans le muscle et les organes lymphoïdes à l'échelle du génome viral et du transcrit, ii) la transduction *in situ* de cellules immunocompétentes dans les organes lymphoïdes et iii) la transduction des DC *in vivo*.

Les résultats sont présentés dans l'article ci-dessous qui sera prochainement soumis au journal *Human Gene Therapy*.

## **Early interaction of AAV8 vector with the host immune system following intramuscular delivery results in weak but detectable lymphocyte and dendritic cell transduction**

Gwladys Gernoux<sup>1,#</sup>, Mickaël Guilbaud<sup>1,#</sup>, Laurence Dubreil<sup>3,#</sup>, Thibaut Larcher<sup>3</sup>, Candice Babarit<sup>3</sup>, Mireille Ledevin<sup>3</sup>, Nicolas Jaulin<sup>1</sup>, Pierre Planel<sup>1</sup>, Philippe Moullier<sup>1,2</sup> and Oumeya Adjali<sup>1</sup>

- (1) INSERM UMR 1089, CHU Nantes, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France
- (2) Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
- (3) INRA UMR 703, ONIRIS, Nantes

This work was done in Nantes, France

(#) These three authors contributed equally

(\*) Corresponding author: Oumeya Adjali, INSERM UMR 1089, [oumeya.adjali@univ-nantes.fr](mailto:oumeya.adjali@univ-nantes.fr)

Key words: AAV8, intramuscular, mouse, gene transfer, lymphocytes, dendritic cells

Short title: In vivo mouse immune cell transduction by AAV8 vectors

**ABSTRACT:**

Following *in vivo* Adeno-Associated-Virus (AAV)-based gene transfer, the occurrence of adaptive immune responses specific to the vector or the transgene product appears nowadays as a potential roadblock to successful clinical translation. The occurrence of such responses depends on several parameters including the route of vector administration as well as the viral serotype and the genome configuration (either self complementary (sc) or single stranded (ss)). These parameters influence AAV vector-associated immunity by modulating the crosstalk between the vector and the host immune system including vector ability to interact or even transduce lymphoid tissues in general and antigen-presenting cells (APCs) in particular. Little is known about immune cell populations that are targeted *in vivo* by AAV vectors and transduction of dendritic cells (DC) is still controversial and not directly demonstrated. Here, we show that intramuscular administration of a sc AAV8 vector in the mouse leads to the rapid detection of viral genomes and transgene transcripts in the lymphoid tissues. Transduced cells were detected in follicular areas of the spleen and the draining lymph nodes. In addition to B and T lymphocytes, transduced professional APC were detected although at very rare frequency. In addition, viral genomes and transgene transcripts were also detected in these cell populations after ss AAV8 vector administration.

## INTRODUCTION

Recombinant adeno-associated vector (rAAV) is a promising platform for *in vivo* gene transfer. Indeed, an increasing number of reports in animal models demonstrate that rAAV administered *in situ* in many different target organs can sustain multiyear gene expression after one single administration (Niemeyer and others 2009; Rivera and others 2005; Stieger and others 2006; Warrington and Herzog 2006). More recently, rAAV have been reported to be vectors of choice for gene therapy of various human genetic diseases as hemophilia, muscular dystrophies or retinal blindness. Nevertheless, immune responses against the transgene and/or the viral capsid have emerged as serious obstacles in the successful translation of protocols to the clinic. Indeed, the expression of heterologous and even autologous proteins using rAAV can be followed by an immune reaction against the transgene product in large animals models (Chenuaud and others 2004; Favre and others 2002; Gao and others 2004; Herzog and others 2001; Ross and others 2006). Moreover, the targeting of the immune system against the rAAV capsid itself was also reported in clinical trials of AAV-mediated gene transfer using AAV of serotypes 1, 2 or 8 (Mingozzi and others 2007b; Mingozzi and others 2009; Nathwani and others 2011).

Several parameters can modulate rAAV-related immunity including vector construct and dose, viral serotype, the purity of viral preparation, as well as the specie of the recipient. Recently, the viral genome was also shown to modulate host immune reaction. Indeed, self-complementary (sc) rAAV were shown to induce increased toll-like receptor (TLR) 9-dependant innate immune responses as compared to single stranded (ss) vectors (Martino and others 2011), thus resulting in stronger adaptative immune responses against the viral capsid. In addition to these factors, the route of vector delivery is definitely a critical factor, even able to shift the balance from an immunogenic to a tolerogenic response towards the transgene product as shown following intrahepatic rAAV administration (Mingozzi and others 2007a; Mingozzi and others 2003). In contrast, the intramuscular (IM) route was shown to generally immunize the host against the transgene product (Chenuaud and others 2004; Favre and others 2002; Gao and others 2004; Herzog and others 2001; Ross and others 2006; Toromanoff and others 2009).

Overall, what might be an early but determinant event for inducing vector-associated immunity is an intricate relationship between the rAAV and the host immune system. After intravenous or IM rAAV delivery, different studies in various species were able to systematically detect the vector in draining lymph nodes, spleen, or even distant lymph nodes (Arruda and others 2004; Favre and others 2001; Haurigot and others 2010; Toromanoff and others 2008; Wang and others 2011; Wang and others 2005a). Nevertheless, very few studies have characterized the nature of transduced immune cell populations in these lymphoid tissues. In particular, the ability of rAAV to transduce APCs including dendritic cells (DC) is still not yet directly established in animal studies

after *in vivo* delivery of the vector, whereas it is determining for the induction of adaptive immune responses. To date, rAAV-mediated transduction of APC was only demonstrated *ex vivo* using either monocyte or bone marrow derived DC. In these studies, AAV serotypes 1, 2, 5 or 6 were able to transduce DC (Aldrich and others 2006; Liu and others 2005; Ponnazhagan and others 2001; Veron and others 2007). In one study, the level of DC transduction and activation was even sufficient to vaccinate mice after *in vivo* delivery with induction of cytotoxic T cell responses with IFN $\gamma$  secretion, proliferation and cytotoxic activity (Liu and others 2005). In addition, sc rAAV were shown to be more efficient than ss vectors (Veron and others 2007), further confirming a potential higher immunogenicity with sc variants, this time against the transgene product itself.

After *in vivo* rAAV delivery, transduction of APC remains controversial and the effect of different serotypes on DC still not well studied. The majority of *in vivo* studies looking at the relationship between injected AAV vectors and the host immune system have dealt with AAV serotypes 1 or 2 following IM vector delivery. Early reports using rAAV of serotype 2 in mice showed poor ability of the vector to transduce DC in comparison to adenoviral vectors (Jooss and others 1998). Another early study confirmed that IM injection of rAAV2.LacZ does not provide sufficient *in vivo* DC transduction and antigen presentation to facilitate an adaptive response, favoring in return the cross-presentation pathway for the induction of T cell responses (Zhang and others 2000). However, in two recent studies (Boisgerault and others 2013; Majowicz and others 2013), IM injection of a mir142.3p-regulated rAAV1 in mice was able to prolong gene transfer while preventing anti-transgene T cell responses and muscle infiltrates respectively. Nevertheless, no direct evidence of APC transduction and mir142.3p-mediated APC off-targeting was demonstrated.

So far, only a limited number of alternative AAV serotypes have been studied *in vivo* with respect to their interaction with immune cells. rAAV8 is becoming a key serotype in preclinical and clinical developments in the skeletal muscle, as well as for metabolic diseases and hemophilia. Only one recent study in mice reported that AAV8 is rather tolerogenic than immunogenic because of poor ability to transduce APC and to induce their activation *in vivo* leading to an aborted adaptive immunity (Mays and others 2013). Here, we aimed to characterize the crosstalk of serotype 8 with the mouse immune system after IM delivery. Preferential transduction of follicular areas in the spleen and the lymph nodes was observed after injection of a sc rAAV8 expressing GFP. In addition to B and T lymphocyte transduction, we also observed DC transduction although at very rare event numbers as reported recently in Mays's study (Mays and others 2013). Moreover, IM delivery of ss AAV8 also allowed the detection of transduced immune cells, although only at a molecular level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### AAV viral genomes and transcripts are detected in muscle, spleen and lymph nodes

Sc rAAV2/8-CVM-GFP vector was injected in the two anterior tibialis muscles (total dose of  $2 \times 10^{11}$  vg) and mice (n=6 to 7 per group) were euthanized at days 7, 15 or 30 post-injection (pi). Mock groups (n=5 to 6) received an IM injection of PBS at an equivalent volume to the injected vector preparation. In addition to the injected muscle, viral genomes (vg) were detected by quantitative PCR in the draining lymph nodes (DLN) and spleen (**Fig. 1A**). An average of  $2.22 \pm 1.12$ ,  $3.17 \pm 1.78$  and  $2.25 \pm 0.94$  vg/diploid genome (dg) was detected in the injected tibialis at days 7, 15 and 30 pi respectively, with no significant increase of copy numbers with time. Similarly to previous studies in rodents and large animal models (Arruda and others 2004; Favre and others 2001; Haurigot and others ; Toromanoff and others 2008; Wang and others 2011; Wang and others 2005a), we also detected the vector genome in the inguinal DLN as well as the spleen as soon as day 7 pi without significant changes with time (**Fig. 1A**). Copy numbers were much lower in lymphoid tissues as compared to the site of vector delivery (2,7 time less in DLN *versus* muscle, and 141,5 time less in spleen *versus* muscle at day 30 pi for instance). Furthermore, the vector was even detected in distant LN chains (ie cervical and axillary, **data not shown**). In another mouse cohort injected *via* the IM route with another construct of sc rAAV8 and followed at earlier time points than the present study, we were even able to detect vector genomes in lymphoid tissues as soon as day 1 post-injection (**Supplementary Fig. 1**). Early vector draining after IM delivery could be due to the concentration of the vector at the site of injection. Moreover, the rapidity of vector biodistribution in the immune system could be higher with serotype 8 than other serotypes as it was described to be able to cross blood vessel walls more easily thus leading to higher distribution to peripheral tissues (Wang and others 2005b). Accordingly and using live animal tracking of viral vectors, Asokan *et al.* also previously demonstrated that IM administration of luciferase-labeled capsids of an AAV8 vector results in a rapid decrease of *in situ* muscle light output (within 30 minutes) as compared to labeled AAV2 vectors, with the detection of AAV8 particles in the liver as soon as 5 minutes post-vector delivery (Asokan and others 2008). In our hands, we were also able to detect significant numbers of vector copies in the liver of our mice again confirming rapid leakage of AAV8 to the liver after IM delivery (**data not shown**, mean of 5,72 to 16,15 vg/dg).

Despite low numbers of vector copies in lymphoid organs, we were able to detect the CMV-driven GFP transgene transcripts by quantitative RT-PCR in both DLN and spleen, and relative quantity (RQ) of transcripts appeared stable until at least day 30 in all organs (**Fig. 1B**). However and similarly to vector copies, transgene transcripts levels were much lower in these organs as compared to the injected muscle ( $\approx 1046$  fold lower in DLN *versus* muscle, and  $\approx 340050$  fold lower in spleen *versus* muscle at day 30 pi for instance).

We next compared the expression activity of one vector copy in these different tissues by calculating the ratio RQ/vg/dg. The values at day 30 pi are represented for injected skeletal muscle and lymphoid tissues in **supplementary Fig.2**. While no difference was observed between DLN and spleen, a statistical difference was observed when these lymphoid organs were compared to the skeletal muscle (a RQ/vg/dg ratio that was 316 and 282 fold lower in LND and spleen respectively *versus* the muscle, P values= 0,0022 and 0,0022 respectively). This difference in transcriptional efficiency could be related to a limited activity of the CMV promoter in the immune cells, as this promoter was already shown to be subjected to silencing in murine, non human primate and human hematopoietic cells, at least in a lentiviral vector context (An and others 2000; Case and others 1999; Miyoshi and others 1999; Salmon and others 2000). Nevertheless, the low level of transgene expression in lymphoid tissues may also reflect a restricted efficiency of rAAV vectors in general, or serotype 8 in particular, to transduce the immune system as hypothesized in earlier studies.

We next wanted to determine whether we were able to detect and characterize the cells that are transduced in lymphoid tissues.

### **Sc AAV8-mediated lymphocyte and dendritic cell transduction in spleen and lymph nodes**

As GFP transcripts were detected in DLN and spleen after IM scAAV2/8 delivery, we next looked at transgene GFP expression by direct fluorescence in these tissues (**Fig. 2**). First and as expected, the transduction of the injected tibialis was efficient as shown in a representative mouse at day 30 pi (**supplementary Fig. 3**) and all the analyzed mice appeared positive for GFP expression in the injected tibialis as early as day 7. In contrast, the number of GFP positive draining lymph nodes and spleen increased with time and not all the mice exhibited GFP signal in these tissues even at day 30 pi (0%, 15% to 30% and 66 to 75% of mice expressing GFP in DLN and spleen at days 7, 15 and 30 pi respectively). This again reflects the lower transduction of lymphoid tissues as compared to the skeletal muscle. GFP expression appeared preferentially localized in follicular areas in both organs (**Fig. 2**). To determine the phenotype of GFP+ cells, we realized anti-CD19 (**Fig. 3A**), antiCD3 (**Fig. 3B**), and anti-F4/80 (**Fig. 3C**) immunostainings targeting B lymphocytes, T lymphocytes and macrophages, respectively. In both spleen and DLN, B lymphocytes appeared as the preferential positive cell population in follicles (**Fig. 3A**). GFP positive T lymphocytes were also detected at the periphery of follicles, although at low numbers (**Fig. 3B**). However, we were not able to detect GFP+ positive F4/80+ macrophages in both spleen and lymph nodes sections (**Fig. 3C**). The low number of transduced T cells may again be related to a preferential negative regulation of the CMV promoter in this population and in our model. However, we cannot exclude a lower efficiency of rAAV8 in this

particular subset of cells. Regarding macrophages and according to our data, other studies have also shown an inefficiency of rAAV2 (Zaiss and others 2008) or rAAV8 (Mays and others 2013) to transduce murine macrophages or human monocytes. One hypothesis was the restriction of 2nd DNA strand synthesis in macrophages (Zaiss and Muruve 2008) because of an innate anti-viral mechanism potentially mediated by APOBEC3 protein that was identified as a potent inhibitor of AAV replication (Chen and others 2006). Nevertheless, here we also demonstrated a restricted ability of rAAV to transduce macrophages despite the use of double stranded DNA viral genomes, which suggests rather a limited efficiency of serotype 8 as also reported by Mays et al. (Mays and others 2013). Although it was shown that macrophages are activated by rAAV transduction in vitro despite limited transduction (Zaiss and others 2002), poor transduction of macrophages/monocytes by rAAV as shown in all these studies may explain why these vectors result in limited innate immune system activation and inflammatory signals as compared to adenoviral vectors.

Because DC transduction is a critical event for rAAV-associated immunity, we also looked at the expression of GFP in CD11c+ myeloid DC in DLN and spleen (**Fig. 3D**). Co-localization of GFP and CD11c marker was observed in follicular areas indicating the presence of follicular transduced myeloid DC. However, GFP-expressing DCs were very rare in positive tissue sections and we were not able to detect them in splenocyte and DLN cell suspensions by flow cytometry (**data not shown**). Moreover, we were not also able to detect positive DC in a large number of injected mice, even at the latest time point further confirming the scarcity of GFP+ positive DC.

The colocalization of GFP signal with lymphocytes and DC in both DLN and spleen tissue sections could be due to a simple uptake of GFP protein (even partially) from the environment without a real transduction, in particular for APC that have the property to phagocyte antigens. This is unlikely to be a central mechanism for the following reasons: (i) GFP transcripts were detected as shown above in both spleen and DLN lymphoid tissues and (ii) GFP signal was observed whatever the ability of cells to phagocyte/ uptake antigens, i.e. positive T cells were detected while no positive macrophages were observed. Nevertheless and in order to confirm lymphocyte and DC rAAV8-mediated transduction, we looked at viral genomes and GFP transcripts in total splenocytes as well as T lymphocyte and DC enriched fractions.

#### **Detection of viral genomes and transgene transcripts in lymphocyte and DC enriched fractions after both sc and ss rAAV8 IM delivery**

Total splenocytes were isolated from a pool of 6 spleens obtained from either sc rAAV8 or PBS (mock) IM-injected mice at day 30 pi. T lymphocytes as well as DC were further enriched using CD3 or CD11c based magnetic cell isolation. The purity of each cell fraction was determined by flow

cytometry and comprised for rAAV injected group between 93,3% and 95,7 % for DC and T lymphocyte fractions as shown in **Fig. 4A and 4B**, respectively. We next quantified viral genomes by qPCR in total splenocytes, T cell, DC as well as the remaining splenic fractions (**Fig. 4C**). In contrast to all mock samples where vg/dg values were all below the sensitivity threshold determined at  $5.10e-4$ , viral genomes were detected in all analyzed fractions including DC. We next looked at GFP transcripts by RT-PCR and southern-blot-based detection (**Fig. 4D**) because quantitative RT-PCR was not enough sensitive in this case. HPRT gene served as a positive control for reverse transcription efficiency. HPRT cDNA was detected in all samples (+RT) but not in reverse-transcriptase-free samples (-RT) confirming that the samples were not contaminated with DNA. In contrast to all mock samples, we were able to detect GFP transcripts in total splenocytes, as well as T lymphocytes and DC. The remaining fraction that was mainly composed of B lymphocytes after T lymphocytes and DC depletions (window of 64,7% to 80,4% of CD19+ cells in 6 different depletion experiments) was also positive. However, we cannot exclude that the signal observed here is also due to other cell types that are present in the fraction.

Single-stranded rAAV vectors were shown, essentially in *in vitro* experiments, to be restricted or at least less efficient than sc rAAV in hematopoietic cells including DC (Veron and others 2007). Along this line, we wanted to assess in our *in vivo* gene transfer model, whether ss AAV8-CMV-GFP vector was able to transduce murine lymphocytes and APC, as observed with sc construct. For this purpose, mice were injected with  $2 \times 10^{11}$  vg/kg in the tibialis muscle and tissues were obtained at day 30 pi. Despite equivalent viral genome copy numbers in the muscle and lymphoid tissues between sc and ss rAAV (**data not shown**), we were not able to detect GFP expression by direct fluorescence (and even by immunostaining) in the spleen as well as the DLN whereas GFP was detected in the injected muscles (**Supplementary Fig.3**) but only in 50% of injected mice. This is in agreement with a lower efficiency of ss vectors to rapidly achieve transgene expression plateau as compared to sc constructs. Using quantitative RT-PCR that is much more sensitive, we were able to detect GFP transgene transcripts in the injected tibialis as well as DLN, although at lower levels than with sc vector (**data not shown**). Nevertheless, qRT-PCR did not detect transgene transcripts in the total spleen. We next assessed whether a RT-PCR assay and southern-blot-based detection will allow us to detect GFP transcripts in the spleen. For that purpose and similarly to sc mice group, total splenocytes as well as T lymphocytes and DC enriched fractions were analyzed at the level of viral genomes and transgene transcripts using q-PCR and RT-PCR/southern-blot respectively (**Fig. 5**). The purity of enriched fractions for ss rAAV achieved 92,6% and 95,2% for DC and T lymphocyte isolations respectively (**Fig. 5A and 5B respectively**). Vector copies were detected by qPCR in all fractions including the remaining population after T lymphocyte and DC depletions (**Fig. 5C**). Southern-blot

allowed the detection of GFP transcripts in total splenocytes as well as DC and T lymphocytes enriched fractions but not in the remaining fraction after both T cell and DC depletions (**Fig. 5D**). These data indicate that single stranded AAV genomes are also able to be functional in immune cells, although the level of transduction was much lower than with sc configuration. In addition of a limited efficiency of ss as compared to sc constructs in the immune cells as reported earlier (Veron and others 2007), it is possible that the level of transcripts has not yet achieved the plateau at day 30 pi with ss rAAV as suggested by the fact that only 50% of the mice were GFP<sup>+</sup> in the muscle itself at this time.

In conclusion, both sc and ss AAV8 vectors were able (at least with our vector dose, around  $1 \times 10^{13}$  vg/kg) to transduce lymphocytes and APC *in vivo*, upon their rapid crosstalk with the host immune system after IM delivery. This transduction was observed despite the use of a promoter with a limited efficiency in the hematopoietic cells, suggesting that it could be even higher with more efficient promoters in the immune system. IM route of delivery may play a critical role in these findings because it results in a high level of transgene expression restricted to a limited number of muscle fibers (Toromanoff and others 2008; Wang and others 2005a) which may favor vector draining to lymph nodes and thus increase the likelihood of antigen-presenting cells (APC) transduction (Sarukhan and others 2001). Nevertheless and in agreement with previous studies, the level of transduction in the immune system in general, and of APC in particular, also appeared in our hands limited, with a lower capacity of ss construct at least at day 30 pi. DCs are potent inducers of adaptive immunity and a limited number of DC is in theory able to induce T cell responses. For instance, in tumor vaccination protocols, intravenous administration of as few as  $9 \times 10^3$  DCs pulsed with tumor peptides is able to induce a measurable antitumor effect (Porgador and others 1996). Nevertheless, to be able to induce such effect, DC must be activated in order to transmit the necessary stimulatory signals to T cells upon antigen presentation. It is then critical to determine whether transduced DCs upon rAAV8 delivery in the muscle are able to do so. In this context, a recent study has described tolerogenic properties for serotype 8 after IM delivery as a result of poor DC recruitment and activation (Mays and others 2013). However, this study used a ss vector, and therefore it would be important to determine whether APC activation and maturation can reach a critical level, sufficient to induce effector T cell responses using self complementary vectors that are more potent to activate TLR9 pathway for instance (Martino and others 2011). Finally, and in addition to the viral genome, the risk of DC-mediated immunogenicity against the transgene may be increased with other serotypes that may have higher tropism for DC or higher ability to activate them. Thus, it is important to design future preclinical and clinical protocols using vector constructs that limit or even avoid APC transduction including tissue specific promoters, potentially associated to DC off-targeting using miRNA target sequences.

## **MATERIAL & METHODS**

This work was performed under the control of our quality management system that is approved by Lloyd's Register Quality Assurance LRQA to meet requirements of international Management System Standards ISO 9001:2008. It has been implemented to cover all activities in the laboratory including research experiments and production of research-grade viral vectors.

### **Vector production**

Self-complementary (sc) and single-strand (ss) AAV serotype 8 vectors were produced by the Vector Core ([www.vectors.nantes.inserm.fr](http://www.vectors.nantes.inserm.fr)) at the University Hospital of Nantes. They were produced by cotransfection of 293 cells with the vector plasmid containing the GFP sequence, the cytomegalovirus (CMV) promoter and the SV40 polyadenylation signal and flanked by two AAV2-ITRs, and the pDP8 plasmid containing viral sequences required for replication and encapsidation. Vectors were purified by cesium-chloride gradient concentrated using the Apollo system (BD Science). Titers were determined in viral genomes/ml, in parallel for both sc and ss batches using dot blot assay.

### **Animals and vector administration**

Experiments were conducted on 9-12 weeks old male C57/B16 mice (Charles River laboratory). After anesthesia by ketamin and xylazin, mice were injected intramuscularly in the two tibialis anterior muscles with  $2 \times 10^{11}$  viral genomes of either sc or ssAA8-CMV-GFP vectors diluted in PBS. The mock group received an equivalent volume of PBS buffer in the two tibialis. Mice were euthanized by isoflurane at day 7, 15 or 30 post-injection. Tibialis anterior muscles, draining inguinal lymph nodes, spleen, liver as well as distant lymph node chains were sampled. All protocols were conducted in accordance with guidelines of the institutional animal care and use committee of Region Pays de Loire.

### **Splenocyte isolation and cell population enrichments**

Spleen was harvested and treated for 30 minutes with collagenase D (Roche, 2mg/mL). The reaction was stopped by adding EDTA 0.1M pH7.2 during 5 minutes. Freshly isolated splenocytes were washed once with 50 mL of PBS-5% FBS solution. Red blood cells were lysed in a lysis buffer ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) during 10 minutes at room temperature. After lysis, cells were washed

twice with 50mL of PBS-5% FBS and cell pellets resuspended in buffer (PBS pH=7,2, 0,5% BSA, 2mM EDTA). Splenocytes of n=6 mice per group were pooled for cell sorting. Dendritic cells were sorted by positive selection using the CD11c MicroBeads mouse kit (Miltenyi). T lymphocytes were subsequently enriched by negative selection using the Pan T Cell Isolation kit (Miltenyi). The remaining fraction after T and DC depletions was eluted.

### **DNA extraction and quantitative real-time PCR**

Total genomic DNA from tissues were extracted after tissue treatment with urea buffer (urea 8M, EDTA 10mM, NaCl 300mM, Tris 100mM) and proteinase K (10mg/mL, Macherey-Nagel) at 56°C and DNA purification by phenol/chloroform. Quantitative real-time PCR were realized on 50 ng of genomic DNA. For quantification of viral genome, GFP sequence was targeted with the following primers: *forward primer*: 5' ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA 3' , *reverse primer* GFPB 5' GGCGGATCTTGAAGTTCACC 3' and GFP Taqman probe: 5' (6 FAM)-3' TAMRA CCG ACA AGC AGA AGA ACG GCA TCA. Albumin gene was quantified as endogen control with the following primers: *forward primer*: 5' ACATAGCTTGCTTCAGAACGGT 3' ; *reverse primer* : 5' AGTGTCTTCATCCTGCCCTAAA 3'. PCR was conducted using ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). The GFP PCR program was the following: initial denaturation 20s at 95°C followed by 40 cycles of 1sec at 90°C and 20sec at 60°C. The Albumin PCR were done using the following program: initial denaturation 20s at 95°C followed by 45 cycles of 3sec at 90°C and 30sec at 60°C. For each sample, Ct values were compared with those obtained with a standard dilution of control plasmids containing either the GFP or the albumin sequences.

### **RNA extraction, reverse-transcription and transcript detection**

Total RNA from tissues cell pellet were obtained after mechanical tissue lysis, 5 min incubation in Trizol (Invitrogen) at room temperature and purification by chloroform extraction. Total RNA were treated with TURBO-DNA-free kit (Ambion) to eliminate DNA contamination. Reverse-transcription reactions were realized using the M-MLV reverse-transcriptase kit (Invitrogen). Reverse-transcribed samples were analyzed by either quantitative PCR described above for viral genome quantification or classical PCR targeting the GFP transgene and the endogenous HPRT. For RT-qPCR, relative quantity (RQ) of transcript levels was determined as  $RQ=2^{-\Delta Ct}$  where  $\Delta Ct= Ct_{transgene} - Ct_{endogenous}$ . For classical PCR, the primers targeting the GFP transgene were: *forward primer* : 5' AAGTTCATCTGCACCACCG 3'; *reverse primer* : 5' TGTTCTGCTGGTAGTGGTCCG 3' and the primers targeting the endogenous HPRT were: *forward primer* : 5'

TGCTGGATTACATCAAAGCAC 3' ; *reverse primer* : 5' CACCAGCAAGCTTGCGACC 3'. PCR were performed using Veriti Applied Biosystems machine. The GFP PCR used the following program: initial denaturation 5 minutes at 95°C following by 35 cycles of 35sec at 94°C, 35 sec at 58°C and 35 sec at 72°C and then 7 minutes at 72°C. The HPRT PCR used the following program: initial denaturation 5 minutes at 95°C following by 40 cycles of 30sec at 94°C , 35 sec at 55°C and 35 sec at 72°C and then 7 minutes at 72°C. The PCR products were detected by souther-blot in 2% agarose gel under denaturing conditions. After hybridation with a GFP labelled probe, revelation was performed using AlkPhos Direct Labeling and Detection System with CDP-Star (Amersham).

### **Immunohistochemistry**

Transverse cryosections of muscles, lymph node or spleen were fixed with PFA 4%, 10 min at room temperature (RT). For immunostainings, tissue sections were incubated in blocking buffer (20% goat serum) during 30 min at RT, then overnight with primary antibodies against F4/80 (1:100 ; AbD Serotec), CD3 (1:200 ; BD), biotinylated CD11c (1:1000, BD). For F4/80 and CD3 immuno-labelings, Alexa fluor (555) conjugated goat anti-rat IgG (1:300; Invitrogen) was used (1 hour incubation at RT). Sections were then incubated with DRAQ5 (1:1000 ; Biostatus Limited) to counterstain nuclei. For CD11c immunolabeling, streptavidine Alexa fluor (633) (1:300; Invitrogen) was used (1 hour incubation at RT). Stained tissue sections were mounted using prolong gold medium (Invitrogen) and observed with a C1 inverted Nikon TE-2000 laser scanning confocal microscope (Nikon, Champigny, France). All immunolabeled sections were scanned serially with a blue 488 nm argon ion laser (to detect the GFP signal), with a red 543 nm helium neon laser (to detect CD3 and F4/80 immunolabeling) and with a red 633 nm helium neon laser (to detect CD11c immunolabeling). Hematoxyllin eosin saffron staining (HES) was performed as per standard histological protocols using formol-fixed and paraffin-embedded sections.

### **Statistical analysis**

Regarding viral genome and transgene transcript quantifications, non-parametric Mann-Whitney statistical test was performed between the control group (PBS) and the experimental groups. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns: not significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the rodent animal facility of UMR INSERM 1064 in Nantes, the Vector Core ([www.vectors.nantes.inserm.fr](http://www.vectors.nantes.inserm.fr)) at the University Hospital of Nantes for providing the rAAV8 vectors, and the flow cytometry platform Cytocell (SFR François Bonamy, Nantes). Financial supports came from the INSERM, the French ministry of health, the INRA, the University Hospital of Nantes, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire, the ANR via the IHU CESTI and the AFM-Telethon (Association Française contre les Myopathies).

## REFERENCES

- ALDRICH WA, REN C, WHITE AF, ZHOU SZ, *et al.* (2006). Enhanced transduction of mouse bone marrow-derived dendritic cells by repetitive infection with self-complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands. *Gene Ther* 13, 29-39.
- AN DS, WERSTO RP, AGRICOLA BA, METZGER ME, *et al.* (2000). Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells. *Journal of virology* 74, 1286-95.
- ARRUDA VR, SCHUETTRUMPF J, HERZOG RW, NICHOLS TC, *et al.* (2004). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 103, 85-92.
- ASOKAN A, JOHNSON JS, LI C, SAMULSKI RJ. (2008). Bioluminescent virion shells: new tools for quantitation of AAV vector dynamics in cells and live animals. *Gene Ther* 15, 1618-22.
- BOISGERAULT F, GROSS DA, FERRAND M, POUPIOT J, *et al.* (2013). Prolonged gene expression in muscle is achieved without active immune tolerance using MicrorRNA 142.3p-regulated rAAV gene transfer. *Human gene therapy* 24, 393-405.
- CASE SS, PRICE MA, JORDAN CT, YU XJ, *et al.* (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2988-93.
- CHEN H, LILLEY CE, YU Q, LEE DV, *et al.* (2006). APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Current biology : CB* 16, 480-5.
- CHENUAUD P, LARCHER T, RABINOWITZ JE, PROVOST N, *et al.* (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 103, 3303-4.
- FAVRE D, BLOUIN V, PROVOST N, SPISEK R, *et al.* (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated

- transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* 76, 11605-11.
- FAVRE D, PROVOST N, BLOUIN V, BLANCHO G, *et al.* (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 4, 559-66.
- GAO G, LEBHERZ C, WEINER DJ, GRANT R, *et al.* (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 103, 3300-2.
- HAURIGOT V, MINGOZZI F, BUCHLIS G, HUI DJ, *et al.* Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol Ther* 18, 1318-29.
- HERZOG RW, MOUNT JD, ARRUDA VR, HIGH KA, *et al.* (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 4, 192-200.
- JOOSS K, YANG Y, FISHER KJ, WILSON JM. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol* 72, 4212-23.
- LIU Y, CHIRIVA-INTERNATI M, YOU C, LUO R, *et al.* (2005). Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 12, 304-12.
- MAJOWICZ A, MACZUGA P, KWIKKERS KL, VAN DER MAREL S, *et al.* (2013). Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *The journal of gene medicine* 15, 219-32.
- MARTINO AT, SUZUKI M, MARKUSIC DM, ZOLOTUKHIN I, *et al.* The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood* 117, 6459-68.
- MAYS LE, WANG L, LIN J, BELL P, *et al.* (2013). AAV8 induces tolerance in murine muscle as a result of poor APC transduction, T cell exhaustion and minimal MHC1 upregulation on target cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*.
- MINGOZZI F, HASBROUCK NC, BASNER-TSCHAKARJAN E, EDMONSON SA, *et al.* (2007a). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 110, 2334-41.
- MINGOZZI F, LIU YL, DOBRZYNSKI E, KAUFHOLD A, *et al.* (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 111, 1347-56.
- MINGOZZI F, MAUS MV, HUI DJ, SABATINO DE, *et al.* (2007b). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13, 419-22.

- MINGOZZI F, MEULENBERG JJ, HUI DJ, BASNER-TSCHAKARJAN E, *et al.* (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077-86.
- MIYOSHI H, SMITH KA, MOSIER DE, VERMA IM, *et al.* (1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283, 682-6.
- NATHWANI AC, TUDDENHAM EG, RANGARAJAN S, ROSALES C, *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365, 2357-65.
- NIEMEYER GP, HERZOG RW, MOUNT J, ARRUDA VR, *et al.* (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113, 797-806.
- PONNAZHAGAN S, MAHENDRA G, CUIEL DT, SHAW DR. (2001). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for ex vivo immunotherapy. *J Virol* 75, 9493-501.
- PORGADOR A, SNYDER D, GILBOA E. (1996). Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 156, 2918-26.
- RIVERA VM, GAO GP, GRANT RL, SCHNELL MA, *et al.* (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105, 1424-30.
- ROSS CJ, TWISK J, BAKKER AC, MIAO F, *et al.* (2006). Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation. *Hum Gene Ther* 17, 487-99.
- SALMON P, KINDLER V, DUCREY O, CHAPUIS B, *et al.* (2000). High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 96, 3392-8.
- SARUKHAN A, CAMUGLI S, GJATA B, VON BOEHMER H, *et al.* (2001). Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol* 75, 269-77.
- STIEGER K, LE MEUR G, LASNE F, WEBER M, *et al.* (2006). Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13, 967-75.
- TOROMANOFF A, ADJALI O, LARCHER T, HILL M, *et al.* (2009). Lack of Immunotoxicity After Regional Intravenous (RI) Delivery of rAAV to Nonhuman Primate Skeletal Muscle. *Mol Ther.*

- TOROMANOFF A, CHEREL Y, GUILBAUD M, PENAUD-BUDLOO M, *et al.* (2008). 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, 1291-9.
- VERON P, ALLO V, RIVIERE C, BERNARD J, *et al.* (2007). Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2. *J Virol* 81, 5385-94.
- WANG L, CALCEDO R, BELL P, LIN J, *et al.* (2011). Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors. *Human gene therapy* 22, 1389-401.
- WANG L, CAO O, SWALM B, DOBRZYNSKI E, *et al.* (2005a). Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther* 12, 1453-64.
- WANG Z, ZHU T, QIAO C, ZHOU L, *et al.* (2005b). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23, 321-8.
- WARRINGTON KH, JR., HERZOG RW. (2006). Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet* 119, 571-603.
- ZAISS AK, COTTER MJ, WHITE LR, CLARK SA, *et al.* (2008). Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 82, 2727-40.
- ZAISS AK, LIU Q, BOWEN GP, WONG NC, *et al.* (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Journal of virology* 76, 4580-90.
- ZAISS AK, MURUVE DA. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* 15, 808-16.
- ZHANG Y, CHIRMULE N, GAO G, WILSON J. (2000). CD40 ligand-dependent activation of cytotoxic T lymphocytes by adeno-associated virus vectors in vivo: role of immature dendritic cells. *J Virol* 74, 8003-10.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Detection of viral genomes and transgene transcripts in the injected muscle and lymphoid organs.** After IM delivery of either scAAV8-CMV-GFP (n=6 to 7) vector or PBS buffer (mock group, n=5 to 6), injected tibialis muscles, draining inguinal lymph nodes and spleens were collected either at day 7, 15 or 30 post-injection. **(A)** Viral genomes were determined by quantitative PCR (qPCR) and expressed as viral genome per diploid genome (vg/dg), **(B)** transcripts were detected by reverse-transcription and qPCR (RT-qPCR) and expressed as relative quantity (RQ). The threshold of PCR sensitivity is represented in grey in each graph. Non-parametric Mann-Whitney statistical test was performed between the control group (PBS) and the experimental groups. \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , ns: not significant. Only significant differences between two groups were highlighted in the figure.

**Figure 2. GFP detection in lymphoid tissues.** Draining lymph nodes and spleens were collected at day 30 post-injection following IM injection of sc AAV8-CMV-GFP vector or PBS (mock group). Hematoxylin eosin saffron (HES) stainings were performed to address histological architecture of the spleen and to localize follicular areas. GFP protein detection was realized by direct fluorescence microscopy observation. Scale bar: 100 $\mu$ m.

**Figure 3. GFP signal colocalization with B cells, T cells and dendritic cells in lymphoid organs.** Draining lymph nodes and spleens were collected at day 30 post-injection following IM injection of sc AAV8-CMV-GFP vector or PBS (mock group). Transduced cells were characterized after immunostainings on frozen tissue sections. Colocalization of GFP protein (green) signal with **(A)** CD19+ B lymphocytes (CD19-red/GFP-green, colocalization: yellow in merge picture, **(B)** CD3+ T lymphocytes (CD3-red/GFP-green, colocalization: yellow in merge picture, **(C)** F4/80+ macrophages (F4/80-red/GFP-green, colocalization: yellow in merge picture) or **(D)** CD11c myeloid dendritic cells (CD11c-red/GFP-green, colocalization: yellow in merge picture). Scale bar: 50 $\mu$ m.

**Figure 4. Detection of viral genomes and transgene transcripts in spleen isolated cell populations after sc AAV8-CMV-GFP IM delivery.**

**(A and B)** Spleen DCs and T lymphocytes were enriched by magnetic sortings at day 30 post-injection after either AAV or PBS (Mock) IM injections. Cell fraction purities were assessed by flow cytometry after CD11c **(A)** and CD3 **(B)** stainings for DC and T cells respectively. The frequency of

CD11c or CD3 positive cells in the enriched fractions (red line) and the initial total splenocyte suspensions (black line) are compared using an overlay histogram. The percentages of DC or T cells for each enriched fraction are indicated in red.

**(C and D)** Viral genomes and transgene transcripts were detected using q-PCR or PCR/southern-blot respectively, in total splenocytes, DC-enriched fractions, T cell-enriched fractions and the remaining fractions after DC and T cell depletions. **C)** Viral genomes are expressed as viral genomes per diploid genome (vg/dg). The threshold of PCR sensitivity is represented in grey in the graph and determined at  $5.10e-4$ . **D)** Transcripts were detected by RT-PCR and Southern blot targeting the GFP sequence. HPRT gene served as a positive control for reverse transcription efficiency. HPRT cDNA was detected in all samples (+RT) but not in reverse-transcriptase-free samples (-RT).

**Figure 5. Detection of viral genomes and transgene transcripts in spleen isolated cell populations after ssAAV8-CMV-GFP vector delivery.**

Mice were injected intramuscularly with ssAAV8-CMV-GFP vector and euthanized at day 30 post-injection. Spleen cell populations were isolated and the presence of viral genomes and GFP transcripts were analyzed in cell fractions.

**(A and B)** Spleen DCs and T lymphocytes were enriched by magnetic sortings and cell fraction purities were assessed by flow cytometry after CD11c **(A)** and CD3 **(B)** stainings for DC and T cells respectively. The frequency of CD11c or CD3 positive cells in the enriched fractions (red line) and the initial total splenocyte suspensions (black line) are compared using an overlay histogram. The percentages of DC or T cells for each enriched fraction are indicated in red.

**(C and D)** Viral genomes and transgene transcripts were detected using q-PCR or PCR/southern-blot respectively, in total splenocytes, DC-enriched fractions, T cell-enriched fractions and the remaining fractions after DC and T cell depletions. **C)** Viral genomes are expressed as viral genomes per diploid genome (vg/dg). The threshold of PCR sensitivity is represented in grey in the graph and determined at  $5.10e-4$ . **D)** Transcripts were detected by RT-PCR and Southern blot targeting the GFP sequence. HPRT gene served as a positive control for reverse transcription efficiency. HPRT cDNA was detected in all samples (+RT) but not in reverse-transcriptase-free samples (-RT).

**Supplementary Figure 1. Detection of viral genomes in DLN and spleen as early as day 1 following IM delivery of an scAAV8 vector**

Another serie of mice consisted in IM injection of  $2 \times 10^{10}$  vg of an sc rAAV8-PGK-GFP vector in the two tibialis muscles or an equivalent volume of PBS (mock group). Groups of mice (n=2 to 10) were euthanized at days 1, 2, 4, 7 or 10 post-vector delivery and viral genomes were quantified using the same q-PCR than the CMV study in the skeletal muscle (**left panel**), the DLN (**central panel**) and the spleen (**right panel**).

**Supplementary Figure 2. The expression efficiency of vector genome copy is much higher in the muscle than in lymphoid tissues**

The ability of one viral genome copy to express the transgene in the skeletal muscle *versus* lymphoid tissues (DLN and spleen) was evaluated by calculating the ratio RQ/vg. It represents the GFP transgene mRNA level normalized with HPRT and divided by the vg/dg ratio for each mouse individually. Results are represented in boxplots. The box extends from the 10th to the 90th percentile, with a line at the median (50th percentile). The whiskers are extended to show the highest and lowest values. The ratios are 200 to 300-fold lower in lymph node and spleen respectively than in injected muscle. Non-parametric Mann-Whitney statistical test reflects this difference. \*\*:  $p < 0.01$ , ns: not significant.

**Supplementary Figure 3. GFP expression in the muscle after IM sc and ss rAAV-CMV-GFP delivery**

GFP expression was assessed in the injected muscle by direct fluorescence using frozen tissue sections. **Left panel**: mock PBS-injected muscle; **central panel**: ss AAV8-CMV-GFP injected muscle; **right panel**: sc AAV8-CMV-GFP injected muscle

Figure 1

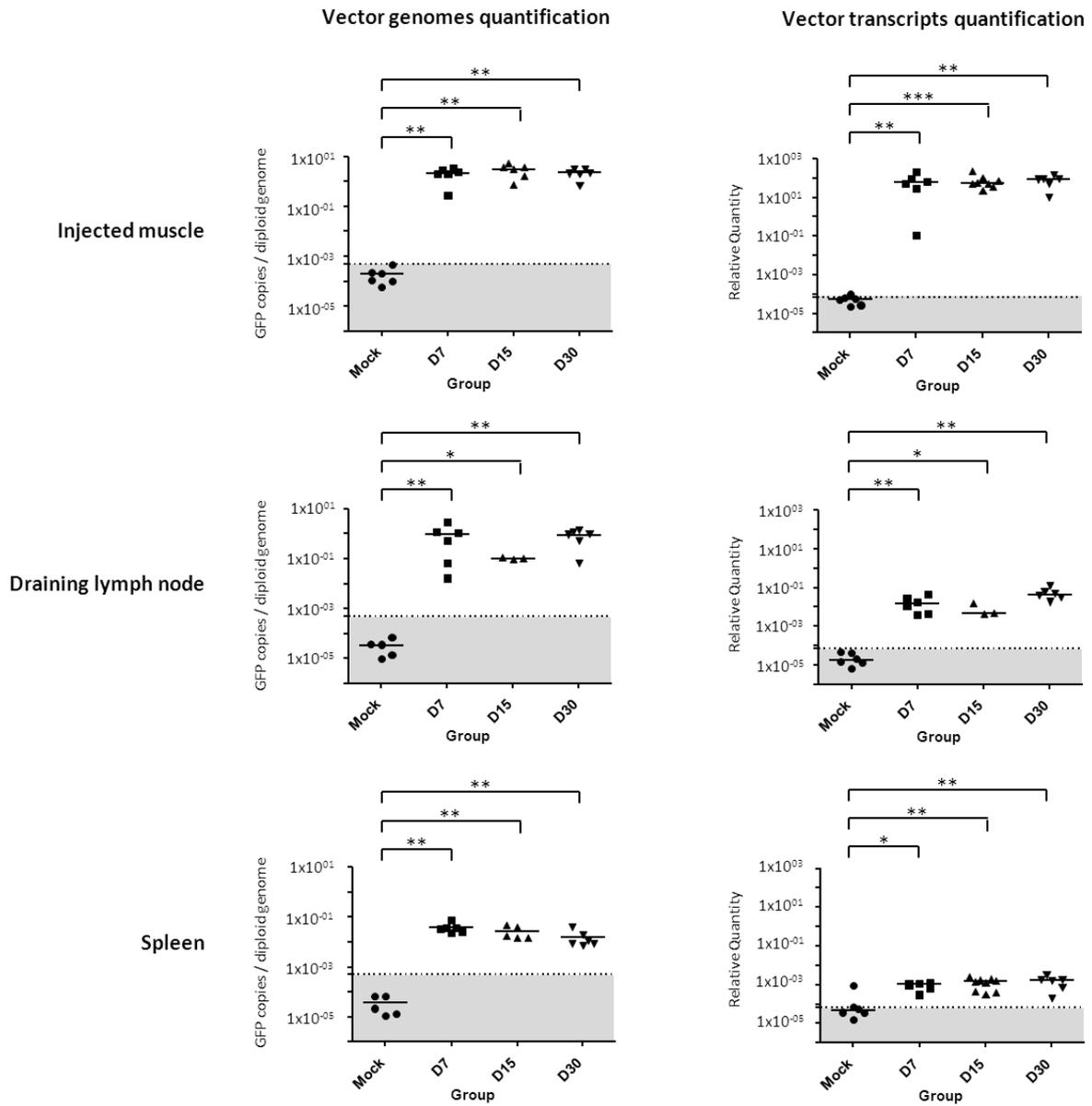


Figure 2

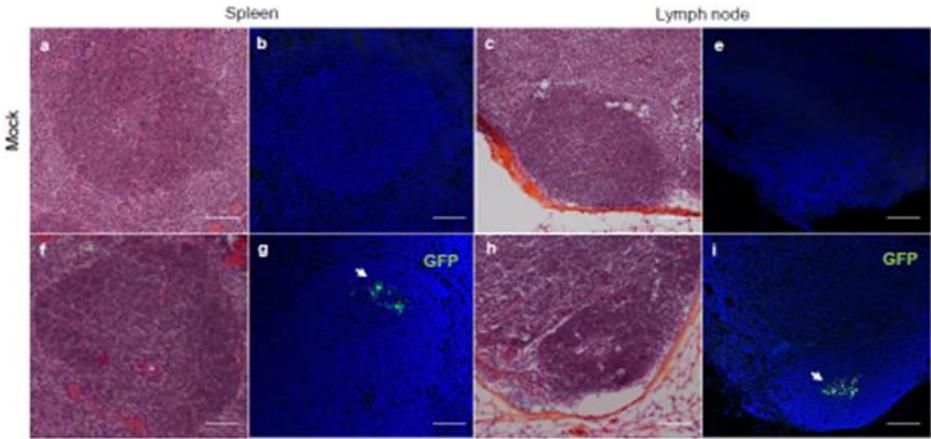
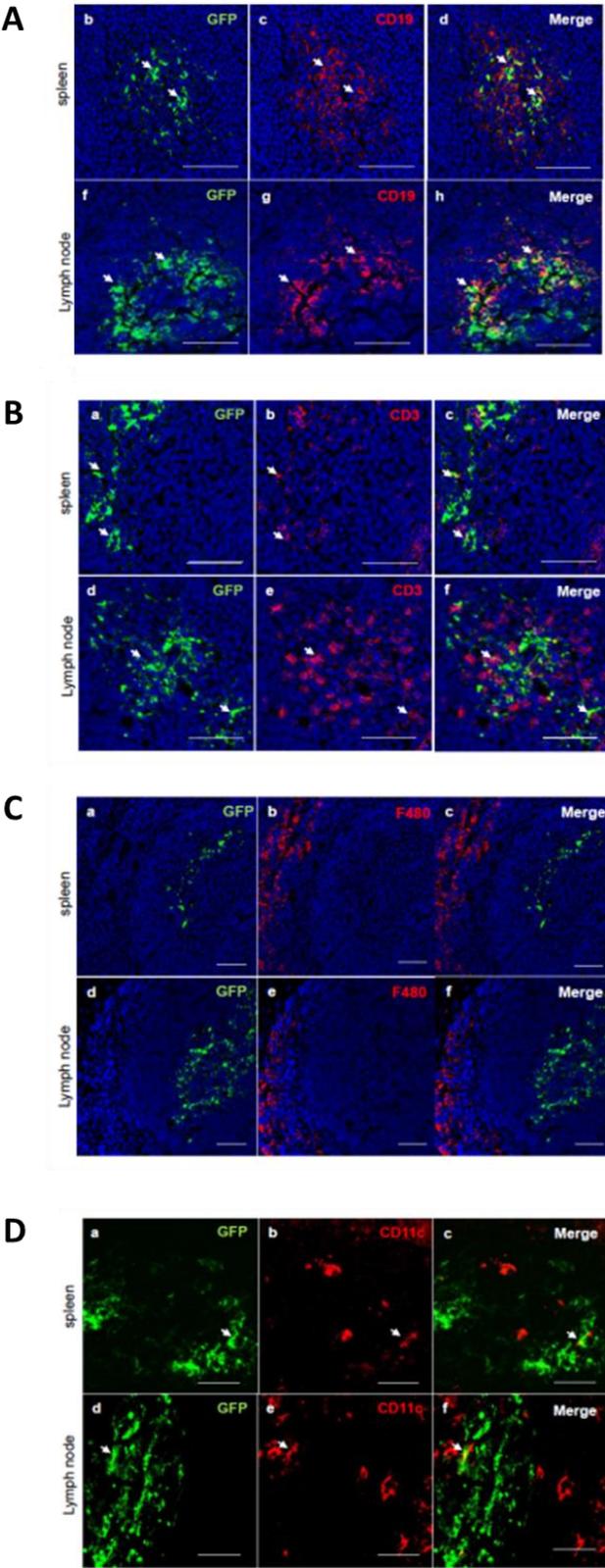
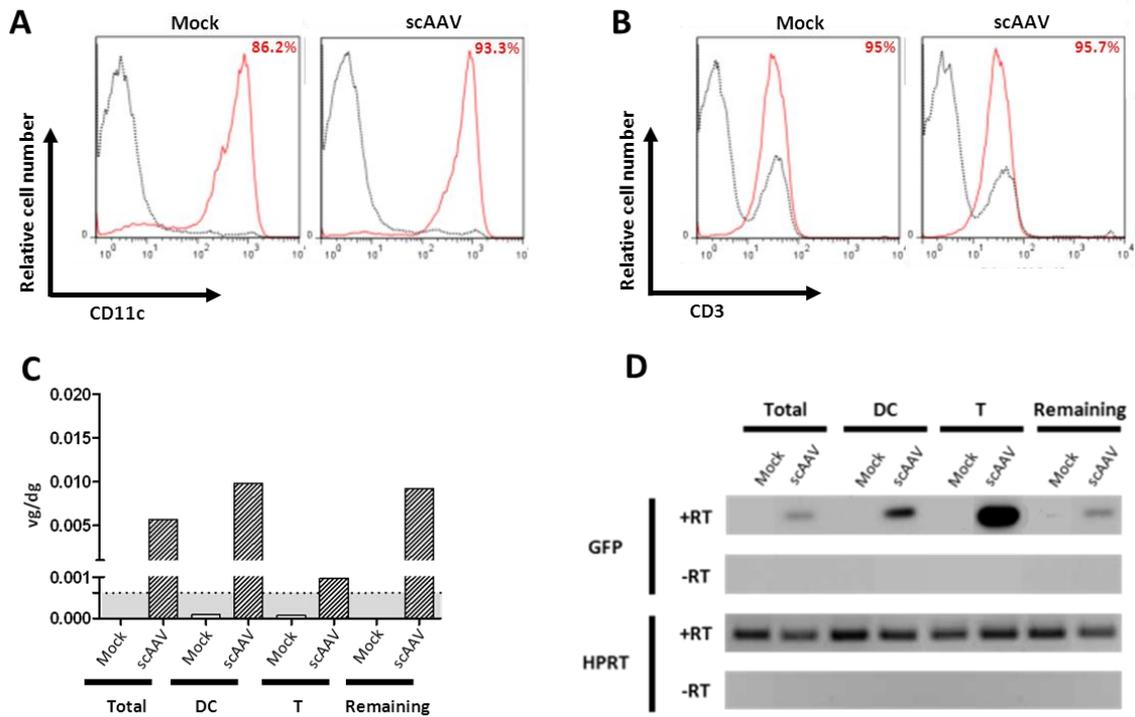


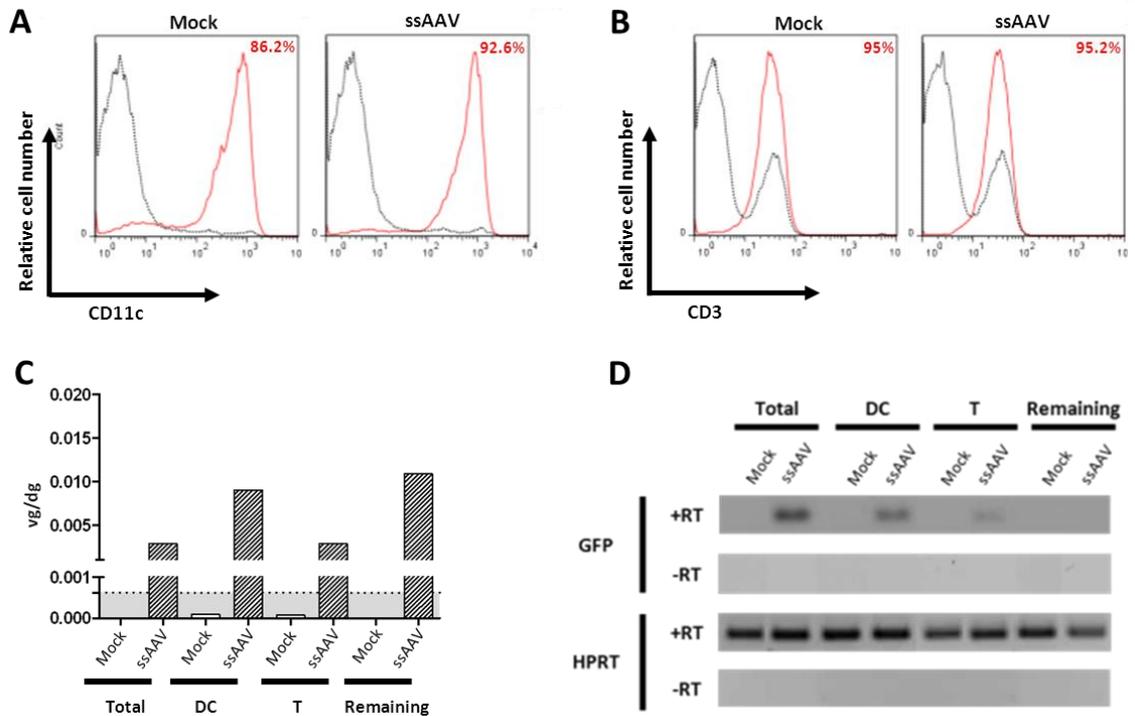
Figure 3



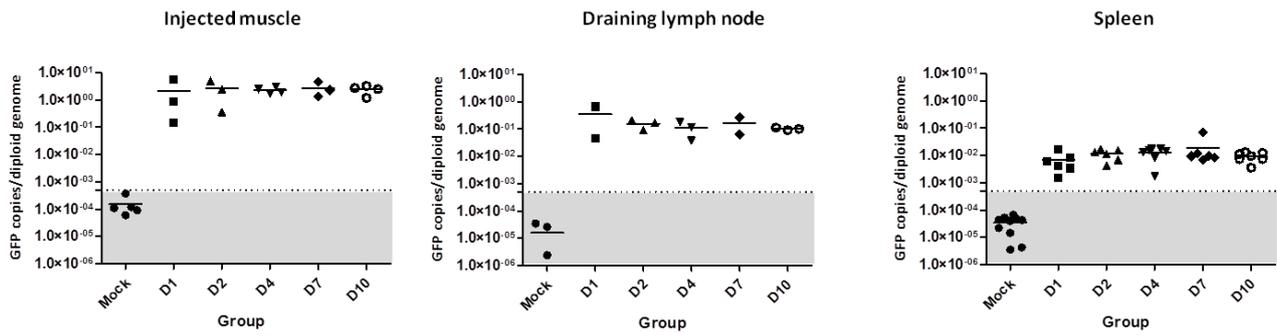
**Figure 4**



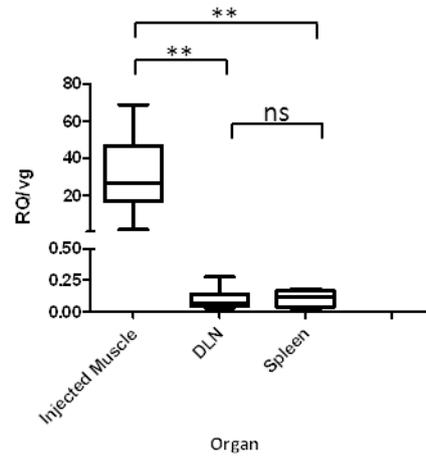
**Figure 5**



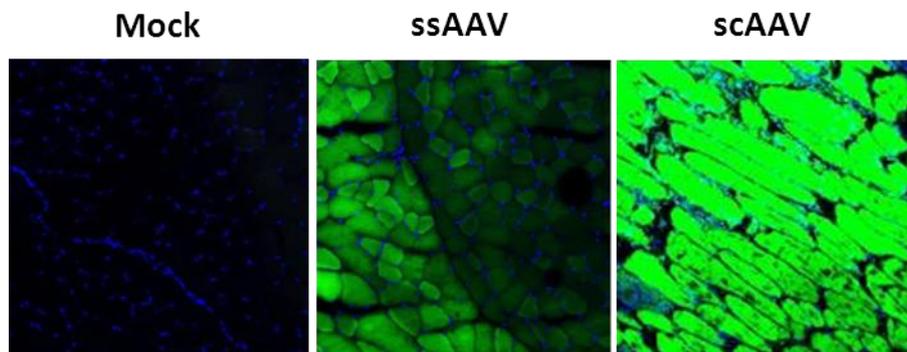
**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**



**En résumé :**

- **L'AAV de sérotype 8 interagit de manière précoce avec le système immunitaire de l'hôte et plus particulièrement les organes lymphoïdes secondaires après administration du vecteur par voie IM.**
- **Le vecteur AAV de sérotype 8 est capable de transduire les lymphocytes T et les DC *in vivo*.**



## ***B. Impact de la voie LR sur la biodistribution du vecteur et sur l'initiation d'une réponse immune.***

### **1. Contexte de l'étude**

Contrairement à la voie IM, la voie LR, dont le protocole d'injection a été transposé dans un modèle de primate au laboratoire, semble moins immunogène et permet une transduction de l'ensemble des muscles du membre injecté. En effet, le laboratoire a montré précédemment que cette voie d'administration permettait une expression à long terme du transgène sans induire de réponse immune délétère (Toromanoff et al. 2010). Dans un contexte d'immunosuppression, cette voie pourrait même initier une réponse lymphocytaire à caractère tolérogénique comme cela a été montré dans un modèle de chien déficient en FIX (Haurigot et al. 2010).

Les mécanismes responsables du maintien à long terme du transgène voire de tolérance après une injection par voie LR ne sont pas bien élucidés. Une des hypothèses évoquées serait que, contrairement à la voie IM, cette méthode d'injection n'entraîne pas une concentration de vecteur au site d'injection et donc n'entraînerait pas un drainage massif d'antigènes provenant de la capsidite ou du produit du transgène dans le ganglion lymphatique le plus proche.

De manière à confirmer que la voie LR est moins immunogène que la voie IM, nous nous sommes placés dans un contexte décrit comme des plus favorables pour l'initiation d'une réponse immune. En effet, des primates ont été injectés, sans aucun traitement immunosuppresseur, avec un vecteur scAAV8 codant pour la protéine GFP. Deux types de promoteurs ont été utilisés : un promoteur desmine spécifique du muscle comme dans l'étude d'A Toromanoff (Toromanoff et al. 2010) et le promoteur ubiquitaire CMV. Un primate a été injecté par voie IM avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP et a été utilisé comme référent en terme d'immunogénicité vis-à-vis du produit du transgène.

Dans cette étude, nous avons analysé i) l'expression de la protéine GFP dans les muscles, ii) la réponse immune humorale et cellulaire dirigée contre la capsidite et contre le

produit du transgène, iii) les interactions entre le vecteur AAV et les organes lymphoïdes et iv) l'impact de la voie LR sur l'expression de cytokines et/ou chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

Les résultats sont présentés ci-dessous. Un article devrait être soumis en novembre 2013 à la revue *Journal of Clinical Investigation*.

## **2. Matériel et méthode**

### **a) Production de vecteurs**

Les AAV self-complementary de sérotype 8 ont été produits par le Centre de Production de Vecteurs de Nantes ([www.vectors.nantes.inserm.fr](http://www.vectors.nantes.inserm.fr)). Ces vecteurs ont été produits par co-transfection de cellules 293 à l'aide d'un plasmide contenant la séquence codant pour la GFP sous le contrôle des promoteurs CMV ou desmine, le signal de polyadénylation SV40 entourée de deux ITR dérivés de l'AAV2 et le plasmide pDP8 contenant les séquences virales nécessaires pour la réplication et l'encapsidation. Les vecteurs ont été purifiés à l'aide d'un gradient de chlorure de césium et les titres ont été déterminés par dot plot et par PCR quantitative (qPCR). Ils sont exprimés en nombre de copies de génome viral par millilitre (vg/mL).

### **b) Animaux et administration du vecteur**

Les expériences ont été réalisées sur des macaques cynomolgus de 3,5 à 6,5 kg provenant de BioPrim (Baziège, France). Ces expériences ont été approuvées par le Comité Régional d'Éthique en Expérimentation Animale (CREEA) de Loire-Atlantique. Sept macaques (Mac 1 à 7) ne présentant pas de facteurs neutralisants pré-existants dirigés contre la capsid de l'AAV8 ont été sélectionnés et répartis en trois groupes. Mac 1 à 6 ont été injectés par voie LR alors que Mac 7 a été injecté par voie IM. Mac 1 à 3 ont reçu un vecteur scAAV8-Des-GFP alors que Mac 4 à 7 ont un reçu un vecteur scAAV8-CMV-GFP. Tous les macaques ont été injectés avec une dose de vecteur de  $7 \times 10^{12}$  vg/kg.

L'injection par voie LR a déjà été décrite par *Su et al, 2005*. Brièvement, ce mode d'injection a consisté à placer un cathéter dans la veine saphène du membre inférieur et un garrot au niveau de l'articulation coxo-fémorale. Le vecteur a été dilué dans un volume de tampon Ringer-Lactate correspondant à 20% du volume du membre (environ 12mL/kg). L'injection a commencé 10 minutes après une période d'ischémie, à une pression de 300 mm Hg. Après l'injection, l'infusion du vecteur est maintenue pendant 10 minutes avant de relâcher le garrot. L'injection par voie IM a consisté à injecter une dose de  $7 \times 10^{12}$  vg/kg de vecteur en cinq points d'injection répartis le long du muscle tibial antérieur. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sous anesthésie à l'aide de kétamine (0,1mL/kg). Les biopsies chirurgicales (muscles, ganglions lymphatiques, rate et foie) ont été réalisées sous kétamine (0.1mL/kg) et médétomidine (0.01-0.04mL/kg). Du méloxicam (1 graduation/kg) a été administré pendant 3 à 5 jours après la chirurgie pour éviter tout inconfort pour l'animal. Les macaques ont été euthanasiés entre 12 et 14 mois après injection et leurs tissus ont été collectés.

### **c) Extraction d'ADN et PCR quantitative**

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir de tissus à l'aide du kit Gentra Puregene (Qiagen). Les génomes viraux ont été quantifiés par qPCR à partir de 50 ng d'ADNg. Deux qPCR ont été réalisées, l'une ciblant la séquence GFP, l'autre ciblant la séquence  $\epsilon$ -globine, gène endogène permettant de normaliser le nombre de copies. Les qPCR ont été réalisées à l'aide de l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). Les amorces utilisées pour la séquence GFP étaient les suivantes : *amorce sens*: 5' ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA 3'; *amorce antisens* : 5' GGCGGATCTTGAAGTTCACC 3' et la sonde utilisée était: 5' (6 FAM)-3' TAMRA CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA. La réaction de qPCR était composée d'un cycle de dénaturation de 20 secondes à 95°C suivi de 40 cycles de 1 seconde à 90°C et 20 secondes à 60°C. Les amorces utilisées pour la séquence  $\epsilon$ -globine étaient les suivantes : *amorce sens*: 5' ACATAGCTTGCTTCAGAACGGT 3' ; *amorce antisens* : 5' AGTGTCTTCATCCTGCCCTAAA 3' et la sonde utilisée était: 5' (6 FAM)-3' TAMRA TGCAGGCTGCCTGGCAGAAGC. La réaction de qPCR était composée d'un cycle de dénaturation de 20 secondes à 95°C suivi de 40 cycles de 3 secondes à 90°C et 20 secondes à

60°C. Pour chaque échantillon, les résultats sont exprimés en nombre de copies de génome viral par génome diploïde (vg/dg). Pour cela, les valeurs de Ct (Cycle threshold) ont été rapportées à une gamme de dilution de plasmides portant les séquences GFP ou  $\epsilon$ -globine et allant de  $10^6$  à 10 copies.

#### **d) Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative**

Les ARN ont été extraits à partir de tissus après une incubation de cinq minutes dans du Trizol (Life Technologies – Invitrogen) à température ambiante et une purification à l'aide de chloroforme. Les ARN ont ensuite été traités à l'aide du kit TURBO-DNA-free (Life Technologies – Invitrogen) pour éliminer tout ADN contaminant. Les réactions de reverse-transcription (RT) ont été effectuées avec le kit MLV reverse-transcriptase (Life Technologies – Invitrogen). La quantification des ARNm a été réalisée par qPCR utilisant une sonde Taqman à l'aide de l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems) en ciblant d'une part la séquence GFP, spécifique du génome viral, et d'autre part la séquence endogène HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase). La séquence GFP a été ciblée à l'aide des amorces et de la sonde décrite précédemment dans le paragraphe *Extraction d'ADN et PCR quantitative*. La séquence HPRT a été quantifiée à l'aide des amorces : *amorce sens*: 5' GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA 3'; *amorce antisens* : 5' TGGAGTCCTTTTCACCAGCA 3' et la sonde : 5' (6 FAM)-3' TAMRA AATCCAAAGATGGTCAAGGTCGCAA. La réaction de qPCR était composée d'un cycle de dénaturation de 20 secondes à 95°C suivi de 40 cycles de 3 secondes à 95°C et 30 secondes à 62°C. Pour chaque échantillon, les résultats sont exprimés en quantité relative (RQ) où  $RQ=2^{-\Delta Ct}$  et  $\Delta Ct= Ct_{transgène} - Ct_{endogène}$ .

#### **e) Isolement de PBMC et de splénocytes**

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité. Le sang a été déposé sur du ficoll (d=1,093) puis centrifugé pendant 20 minutes à 760g à température ambiante. L'anneau correspondant aux cellules mononucléées a alors été prélevé puis les cellules ont été lavées avec 50mL de PBS-5% SVF. Les globules rouges ont ensuite été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA)

pendant 10 minutes à température ambiante. Après la lyse, deux lavages ont été réalisés avec 50 mL de PBS-5% SVF. Les culots cellulaires ont été repris dans du SVF pour la congélation ou dans du milieu RPMI pour une analyse directe.

Les splénocytes ont été isolés à partir des rates de primate prélevées à 60 jours post-injection. Les cellules ont été obtenues après dissociations mécanique et enzymatique. Cette dernière consistait en un traitement à la collagénase D (2 mg/mL) suivi d'une incubation de 30 à 45 min à 37°C. De l'EDTA 0,1M pH7,2 a alors été rajouté pour arrêter la digestion enzymatique. Les suspensions cellulaires ont été récupérées après passage sur un tamis 100µm et centrifugées 10 minutes à 580g à +4°C. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après la lyse, deux lavages ont été réalisés avec 50 mL de PBS-5% SVF. Les culots cellulaires ont été repris dans du SVF pour la congélation ou dans du milieu RPMI pour une analyse directe.

#### **f) Expression de la GFP dans le muscle, marquage hématoxyline-éosine-safran (HES) et caractérisation des infiltrats musculaires**

Des coupes d'une épaisseur de 4 à 10 micromètres ont été réalisées à partir des échantillons de muscles et étalées sur des lames de polylysine. L'analyse de la présence de la protéine GFP a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Nikon, C1, Champigny sur Marne, France) équipé d'un laser à argon ionisé (488nm). Pour les colorations HES, les noyaux ont été colorés avec l'hématoxyline, les cytoplasmes avec de l'éosine-érythrosine et le tissu conjonctif avec du safran. Les coupes ont été lavées avec de l'alcool puis déshydratées avec du toluène.

Pour les marquages de LT CD4, LT CD8, LB et de macrophages, les coupes ont été saturées avec du PBS-10% de sérum de primate pendant 45 minutes à température ambiante puis à +4°C sur la nuit avec les différents anticorps primaires. Les anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD79 et anti-L1 ont été utilisés pour détecter la présence de LT CD4, LT CD8, LB et de macrophages respectivement. Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps couplés à l'Alexa fluor 488 (Life Technologies - Molecular Probe) ou à l'Alexa

fluor 555 (Life Technologies - Molecular Probe). Les coupes ont ensuite été montées en Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA). Les coupes marquées ont été analysées en utilisant un laser à argon ionisé (488nm) pour observer la protéine GFP et les cellules positives en CD4 et CD8 et un laser à hélium-néon (543nm) pour observer les cellules positives en CD3, CD79 et L1. Chaque image a été enregistrée sur un canal séparé et superposée pour mettre en évidence la colocalisation de signaux fluorescents.

Pour la détection de cellules positives en Foxp3, des coupes d'une épaisseur de 7 à 8µm ont été réalisées à partir des échantillons de muscles et étalées sur des lames de polylysine. Les coupes ont été fixées avec de l'acétone et du méthanol puis perméabilisées avec du Triton X-100 5%. Les coupes ont ensuite été saturées avec du PBS-10% de sérum de chèvre pendant une heure à température ambiante puis incubées avec l'anticorps anti-FoxP3. Les coupes ont été incubées avec un anticorps biotinylé puis avec de la streptavidine couplée à la peroxydase. Enfin, les coupes ont été incubées avec le substrat, colorées avec l'hématoxyline et déshydratées avec de l'alcool.

#### **g) Réponse humorale dirigée contre la protéine GFP et la capsid de l'AAV8 dans le sérum de primate**

*Réponse humorale anti-GFP.* Les anticorps dirigés contre la protéine GFP ont été détectés à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Des plaques 96 puits (Nunc 96 well plates (Thermo scientific)) ont été incubées à +4°C sur la nuit avec 100ng par puits de protéine GFP recombinante (Millipore) diluée dans un tampon carbonate (carbonate 0,1M, pH=9,6). Les plaques ont été lavées à l'aide du tampon de lavage (PBS-Tween 0,1%) et saturées avec le tampon de saturation (PBS-Tween 0,1% gélatine 1%) pendant deux heures à 37°C. Après trois lavages, les sérums des primates dilués en série ont été incubés pendant 2 heures à 37°C. Les contrôles positifs ont consisté à utiliser un anticorps anti-GFP commercial (Millipore) et un sérum d'un animal immunisé contre la GFP. Les plaques ont été lavées en tampon de lavage puis incubées pendant une heure à 37°C avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Southern Biotech, anticorps polyclonal de chèvre anti-rhésus/HRP). Après trois lavages, le substrat (Tétraméthylbenzidine (TMB), BD) a été ajouté puis incubé pendant cinq minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée avec de l'acide phosphorique 1M. Les plaques ont été lues à l'aide d'un spectromètre

(Multiscan GO, ThermoScientific) à 450 nm avec une correction à 570 nm. Le titre en anticorps correspond à la dernière dilution où la valeur de densité optique (DO) est supérieure à la moyenne des DO d'échantillons négatifs (n=22) à la même dilution  $\pm$  2SD.

*Réponse humorale anti-AAV8.* Cette analyse a consisté à rechercher d'une part la présence de facteurs neutralisants et d'autre part la présence d'IgG anti-AAV8. Les facteurs neutralisants sériques (avant injection et à J60 post-injection) contre l'AAV8 ont été détectés à l'aide d'un test d'inhibition de la transduction. Les cellules HeLaT ont étéensemencées en milieu DMEM complété avec 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Chaque puits a été transduit avec de l'adénovirus sauvage à une MOI (Multiplicity of Infection) de huit particules infectieuses par puits. Des dilutions en séries (de 1/10 à 1/1x10<sup>7</sup>) des sérums à tester ont été réalisées dans du milieu DMEM-2% SVF. 4x10<sup>3</sup> génomes viraux par puits d'un vecteur AAV codant pour le LacZ ont été incubés avec les sérums dilués ou le milieu seul (témoin de transduction) pendant 20 minutes à température ambiante avant d'être ajoutés aux cellules HeLaT. Le contrôle négatif a consisté à incuber le vecteur avec un sérum de primate connu pour ne pas présenter de facteurs neutralisants alors que le contrôle positif a consisté à incuber le vecteur avec un sérum de primate connu pour présenter des facteurs neutralisants contre l'AAV8. Après 24 heures, les cellules ont été incubées avec 500µL de PBS-glutaraldéhyde 0,5% puis rincées avant d'être incubées avec le X-gal pendant 6 heures à 37°C. L'efficacité de transduction est analysée en évaluant le nombre de cellules exprimant la β-galactosidase. Le titre correspond à la dilution la plus forte à laquelle la transduction de l'AAV est inhibée à 100%.

Les anticorps dirigés contre la capsid de l'AAV8 ont quant à eux été détectés à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Des plaques 96 puits (Nunc 96 well plates (Thermo scientific)) ont été incubées à +4°C sur la nuit avec 5x10<sup>9</sup> vg par puits d'un vecteur AAV8 dilué dans un tampon carbonate (carbonate 0,1M, pH=9,6). Les plaques ont été lavées à l'aide du tampon de lavage (PBS-Tween 0,1%) et saturées avec le tampon de saturation (PBS-Tween 0,1% gélatine 1%) pendant 2 heures à 37°C. Après 3 lavages, les sérums des primates dilués en série ont été incubés pendant 2 heures à 37°C. Les contrôles positifs ont consisté à utiliser un anticorps anti-AAV8 (ADK8 (Progen), fourni par le laboratoire de Kleinshmidt) et un sérum de primate immunisé contre l'AAV8. Les plaques ont été lavées en tampon de lavage puis incubées pendant une heure à 37°C avec un anticorps secondaire polyclonal de chèvre dirigé contre les Ig humaines et couplé à la biotine (Jackson). Les plaques ont ensuite été lavées avec le tampon de lavage et incubées pendant une heure à

37°C avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (Vector Laboratories). Après trois lavages, le substrat (Tétraméthylbenzidine (TMB), BD) a été ajouté puis incubé pendant cinq minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée avec de l'acide phosphorique 1M. Les plaques ont été lues à l'aide d'un spectromètre (Multiscan GO, Thermoscientific) à 450 nm avec une correction à 570 nm. Le titre en anticorps correspond à la dernière dilution où la valeur de densité optique (DO) est supérieure à la moyenne des DO d'échantillons négatifs (n=29) à la même dilution  $\pm$  2SD.

#### **h) Réponse cellulaire dirigée contre la protéine GFP et la capsid de l'AAV8**

*Réponse cellulaire anti-GFP.* Un test ELISpot (Enzyme-linked Immunosorbent Spot) a été utilisé pour mesurer la sécrétion d'IFN $\gamma$ , d'IL2 ou d'IL10 à partir de splénocytes totaux ou de splénocytes déplétés en CD4 ou CD8 ou de PBMC envers la protéine GFP. Les splénocytes ont été déplétés en LT CD4 ou LT CD8 par sélection positive à l'aide des kits Special StemSep Rhesus CD4+ or CD8+ Tetramer (StemCell Technologies). Les cellules ont été stimulées avec une banque de peptides chevauchants (15 acides aminés chevauchant sur 10) recouvrant la séquence codant pour la protéine GFP (Pepscreen, Sigma). Les peptides ont été répartis en deux ou cinq pools (Pool 1 et 2 ou 1 à 5).

*Réponse cellulaire anti-AAV8.* Un test ELISpot (Enzyme-linked Immunosorbent Spot) a été utilisé pour mesurer la sécrétion d'IFN à partir de PBMC envers la protéine VP1 de la capsid de l'AAV8. Les cellules ont été stimulées avec une banque de peptides chevauchants (15 acides aminés chevauchant sur 10) recouvrant la séquence codant pour la protéine VP1 de la capsid de l'AAV8 (Pepscreen, Sigma). Les peptides ont été répartis en trois pools (Pool 1 à 3).

Concernant la méthodologie expérimentale, des plaques 96 puits (Multiscreen filter plates, Millipore) ont été incubées à +4°C sur la nuit avec les anticorps anti-IFN $\gamma$  (Mabtech), anti-IL2 (Ucytech) ou anti-IL10 (Ucytech) dilués dans du PBS 1X. Les plaques ont ensuite été lavées avec du PBS 1X et saturées avec du milieu RPMI-10% SVF pendant deux heures à 37°C.  $2 \times 10^5$  cellules ont été déposées dans chaque puits et incubées avec les différents pools de peptides (10 $\mu$ g/mL) ou la phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10ng/mL)/ionomycine (iono, 250ng/mL) utilisée comme contrôle positif ou encore avec un pool de peptides ne codant pour aucun antigène connu chez le primate et utilisé comme témoin négatif. Toutes les

conditions ont été réalisées en triplicat. Les cellules ont ensuite été incubées 48 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> puis lavées une fois à l'H<sub>2</sub>O avant d'être incubées pendant 10 minutes dans de l'H<sub>2</sub>O. Les puits ont été lavés avec du PBS 1X puis incubés avec des anticorps couplés à la biotine dirigés contre l'IFN $\gamma$ , l'IL2 ou l'IL10 pendant deux heures à 37°C. Les puits ont ensuite été lavés et incubés avec de la phosphatase alcaline diluée dans du PBS 1X-0,5% SVF pendant une heure à 37°C. Après lavages, le substrat (BCIP/NBT, Sigma) a été ajouté et incubé pendant neuf minutes à température ambiante. La réaction a été stoppée avec de l'H<sub>2</sub>O. Le nombre de spots a été déterminé à l'aide d'un lecteur (ELISpot reader ELR07, AID) et analysé avec le logiciel ELISpot Reader V7.0 (AID). Les réponses ont été exprimées en nombre de spots (Spot Forming Colony, SFC) par 10<sup>6</sup> cellules. Elles ont été considérées comme positives quand le nombre de SFC/10<sup>6</sup> cellules est supérieur à 50 et au moins 3 fois supérieur au nombre de spots détectés avec la condition stimulée avec le pool de peptides témoin négatif. Une analyse statistique a également été réalisée avec le test DFR (Moodie et al. 2010).

#### **i) Détection de cytokines dans le plasma**

Les plasmas des primates ont été collectés à des temps précoces post-injection : entre 1 et 30 jours. Le sang a été prélevé en tube EDTA et centrifugé pendant 8 minutes à +4°C, à 3000 rpm. Le surnageant correspondant au plasma a été récupéré et conservé à -80°C. Les cytokines inflammatoires contenues dans le plasma ont été quantifiées à l'aide du kit Multiplex Primate (Fluorokine MAP, R&D). Les résultats ont été analysés à l'aide du Luminex Analyzer (BioPlex 200, BioRad).

#### **j) Analyses de 84 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire dans les muscles et ganglions lymphatiques**

Les ARN ont été extraits à partir de tissus après une incubation de cinq minutes dans du Trizol (Life Technologies – Invitrogen) à température ambiante et une purification à l'aide de chloroforme. Les ARN ont ensuite été traités à l'aide du kit RNase-Free DNase Set

(Qiagen) pour éliminer tout ADN contaminant. Les ARN ont été concentrés grâce au kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen). Les réactions de reverse-transcription ont été réalisées à partir de 500 ou 300 ng d'ARN pour les ganglions lymphatiques et muscles respectivement à l'aide du kit RT<sup>2</sup> First Strand (Qiagen). Les 84 gènes impliqués dans la réponse inflammatoire ont été analysés à l'aide des plaques RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen) sur l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.

### **k) Analyses phénotypiques des PBMC**

Pour les analyses phénotypiques, les LT et LB ont été marqués à l'aide des anticorps anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD20 respectivement. Les cellules NK ont été marquées avec un anticorps anti-CD56. Les Treg ont été identifiés à l'aide des marqueurs CD3/CD4/CD25/CD127/Foxp3. Les PBMC ont été marqués pendant 20 minutes à +4°C à l'obscurité. Le marquage intracellulaire réalisé pour l'anticorps anti-Foxp3 a été effectué à l'aide du kit Anti-Human Foxp3 Staining Set (eBioscience). Les différentes populations ont été analysées par cytométrie en flux avec le cytomètre LSR II (BD) de la plate-forme de cytométrie de la Structure Fédérative de Recherche (SFR) François Bonamy. Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel FlowJo V7.6.5 (BD).

## **3. Résultats**

Dans cette étude, des primates ont été injectés par voie LR avec un vecteur scAAV8-Des-GFP (Mac 1 à 3) ou un vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4 à 6) à une dose de  $7 \times 10^{12}$  vg/kg. Un primate a également été injecté par voie IM avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP et a été utilisé comme référent en terme d'immunogénicité envers le produit du transgène. Ce primate a reçu la même dose que les autres individus répartie en 5 points d'injection dans le muscle tibial antérieur (**Tableau 4**).

Animal	Serotype	Mode d'injection	Dose (vg/kg)	Promoteur	Suivi
Mac 1	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	Desmine	8,5 mois
Mac 2	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	Desmine	6,5 mois
Mac 3	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	Desmine	8 mois
Mac 4	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	CMV	1 an
Mac 5	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	CMV	1 an
Mac 6	scAAV8	LR	7x10 <sup>12</sup>	CMV	1 mois
Mac 7	scAAV8	IM	7x10 <sup>12</sup>	CMV	1 an

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des doses de vecteurs injectés, de la voie d'administration et du promoteur utilisés dans l'étude.** Trois macaques ont été injectés avec un vecteur scAAV8-Des-GFP (Mac 1 à 3) par voie LR, 4 macaques ont été injectés avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP. Mac 4, 5 et 6 ont reçu le vecteur par voie LR, Mac 7 par voie IM. Tous les primates ont reçu la même dose de vecteur de 7x10<sup>12</sup> génomes viraux par kilogramme (vg/kg).

#### a) Expression de la GFP à long terme dans les muscles du membre injecté après administration du vecteur par voie LR

Afin de confirmer que la voie LR permet une expression du transgène à long terme comme cela a été décrit auparavant (Toromanoff et al. 2010, Haurigot et al. 2010), nous avons analysé l'expression de la protéine GFP dans les muscles. Pour cela, la présence de la protéine GFP a été analysée par fluorescence directe dans les muscles du membre injecté chez les primates injectés par voie LR et dans le muscle injecté (tibial crânial) chez le primate injecté par voie IM. Nos résultats montrent que, bien que la protéine GFP soit connue pour être immunogène chez le primate, elle est exprimée jusqu'à au moins trois mois chez les primates injectés avec le scAAV8-Des-GFP (**Figure 24A**). En plus d'un potentiel rôle de la voie LR ici, il est possible que l'expression de la protéine soit maintenue jusqu'à au moins trois mois grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique du muscle. En effet, un tel promoteur peut restreindre l'expression du transgène dans les APC et empêcher la réponse immune (Boisgerault et al. 2013).

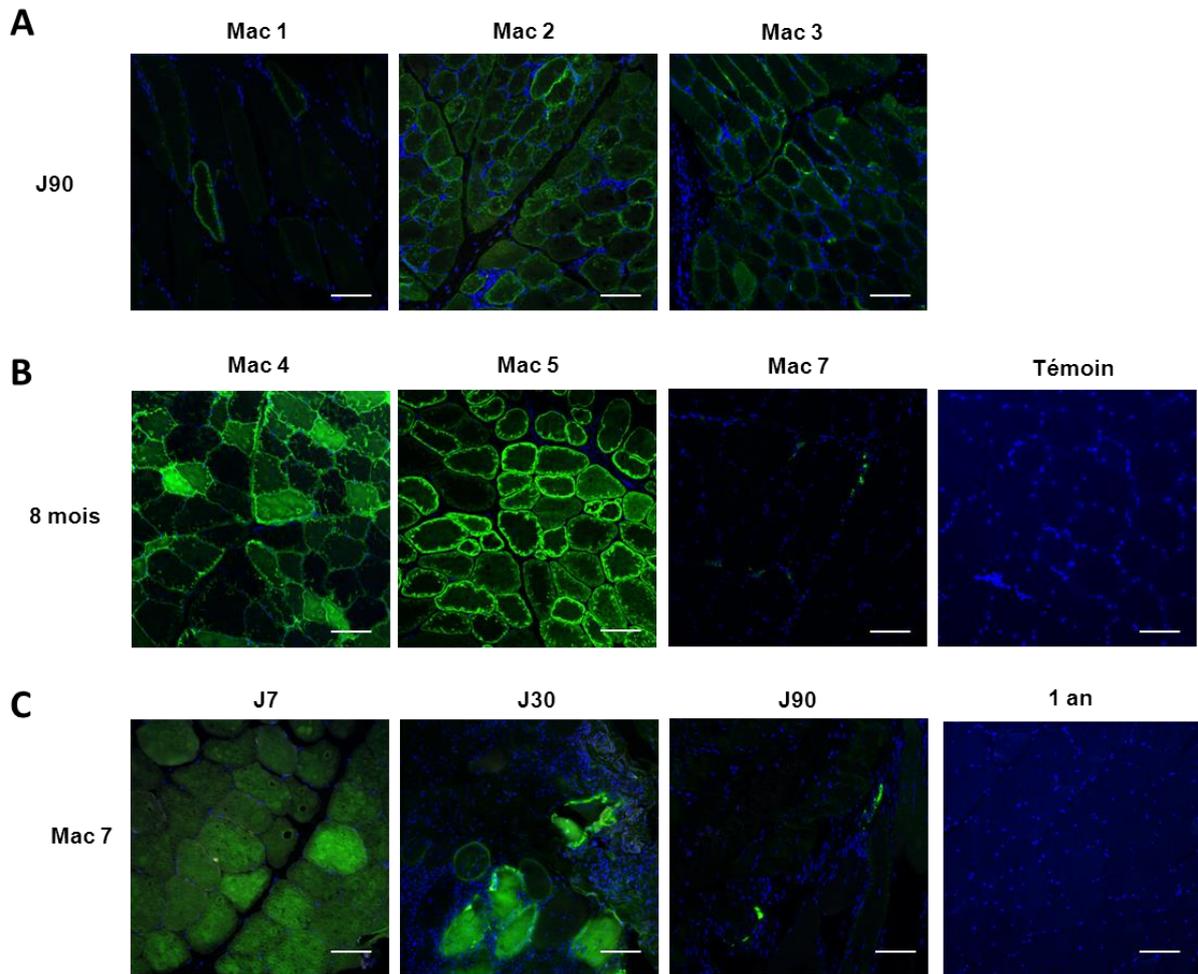
C'est pourquoi, nous avons choisi d'injecter un autre groupe de primate avec un vecteur codant pour la protéine GFP sous contrôle du promoteur ubiquitaire CMV par voie LR (Mac 4 à 6). Un macaque (Mac 7) a été injecté avec le même vecteur par voie IM et a été considéré comme un animal référent en matière d'immunogénicité de la GFP. L'expression de

la protéine a été analysée à huit mois post-injection dans les muscles du membre injecté (**Figure 24B**). Nos résultats montrent que la protéine GFP est détectée jusqu'à huit mois et même jusqu'à un an post-injection (résultats non-présentés) chez les primates injectés par voie LR. Cette analyse à long terme n'a malheureusement pas pu être réalisée chez Mac 6 qui a été euthanasié à un mois post-injection pour des raisons sanitaires. Contrairement aux macaques du groupe LR, le primate injecté par voie IM montre seulement une expression transitoire de la protéine (entre J7 et J30). En effet, la GFP n'était plus détectable dès J90, ce qui suggère son élimination dans ce cas (**Figure 24C**).

Ces résultats sont en accord avec l'analyse de la présence de transcrite de génome viral par RT-PCR quantitative dans ces mêmes muscles puisque la quantité relative de transcrite à un an post-injection chez les primates LR est comprise dans le tibial antérieur entre 4,78 et 7,06 pour Mac 4 et 5 respectivement contre 0,01 et 0,15 pour Mac 7 dans ce même muscle pour les sites d'injection #3 et #2 respectivement. Par contre et de manière étonnante, du génome viral est toujours détecté à un an post-injection chez ce primate et ce, à un niveau comparable aux primates injectés par voie LR : entre 0,15 et 0,51 vg/dg dans le tibial antérieur selon le site d'injection pour Mac 7 contre 0,1 et 0,22 copies dans le même muscle pour Mac 4 et 5 respectivement. Ces résultats suggèrent que la perte d'expression de la protéine GFP ne serait peut-être pas entièrement due à l'élimination des cellules transduites mais également à une régulation de l'expression du transgène secondaire aux signaux inflammatoires *in situ*.

Enfin, l'analyse de la biodistribution du vecteur montre que la voie LR, couplée à l'utilisation du sérotype 8, permet une diffusion du vecteur à distance du site d'injection. En effet, du génome viral est détecté dans le membre supérieur à long terme chez tous les primates : de 0,001 à 0,14 chez Mac 1 et Mac 4 respectivement. Ces résultats sont en accord avec les observations d'une étude précédente effectuée au laboratoire (Toromanoff et al. 2008) et va dans le sens d'une diffusion de l'AAV de sérotype 8 à travers les barrières endothéliales comme décrit auparavant (Wang et al. 2005).

En conclusion, nos résultats confirment que la voie LR permet de maintenir l'expression d'un transgène, même immunogène, à long terme chez le primate quelle que soit la nature du promoteur : spécifique d'un tissu ou ubiquitaire.



**Figure 24 : Expression de la protéine GFP dans les muscles des primates injectés avec un vecteur scAAV8 GFP.** **A)** Les primates ont été injectés dans le membre postérieur avec un vecteur scAAV8-Des-GFP par voie LR. Les biopsies musculaires ont été réalisées dans les muscles du membre injecté : le biceps fémoral (Mac 1 et 3) ou le tibial antérieur (Mac 2) à J90 après l'injection. Les observations par fluorescence directe montrent une persistance de l'expression de la protéine GFP dans le membre injecté chez les trois primates. **B)** Les primates ont été injectés dans le membre postérieur avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 et 5) ou par voie IM (Mac 7). Les biopsies musculaires réalisées dans le tibial crânial du membre injecté ont été collectées à huit mois post-injection. Un muscle prélevé sur un primate non-injecté est montré ici comme témoin négatif puisqu'il ne montre pas de fluorescence intrinsèque. **C)** Des biopsies musculaires ont été réalisées dans le muscle injecté de Mac 7 à J7, J30, J90 et à un an post-injection. Echelle : 100µm

		Analyse précoce				Analyse à long terme							
		Ganglion drainant	Ganglion controlatéral	Rate	Foie	Tibial antérieur	Biceps femoral	Gastrocnémien	Gracile	Biceps brachial	Foie	Ganglion drainant	Ganglion controlatéral
Mac 1	vg/dg	2.39	0.30	0.44	29.60	0.07	0.005	NA	NA	0.006	NA	NA	NA
	RQ	nd	nd	nd	0.03	2.9	0.18			nd			
Mac 2	vg/dg	6.92	0.90	1.36	21.40	0.02	0.07	NA	NA	0.01	NA	NA	NA
	RQ	nd	nd	nd	0.05	0.89	0.36			nd			
Mac 3	vg/dg	2.58	0.61	0.86	11.90	0.03	0.4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	RQ	nd	nd	nd	0.03	0.18	2.52						
Mac 4	vg/dg	10.50	0.54	0.86	2.79	0.10	0.13	0.39	0.11	0.14	0,30	0.09	0.2
	RQ	0.06	0.06	nd	nd	4.78	8.04	36.20	9.83	2.41	nd	0.06	0.06
Mac 5	vg/dg	16.90	0.82	1.23	5.29	0.22	0.10	0.21	0.55	0.10	0,87	0.4	0.06
	RQ	0.06	0.04	nd	nd	7.06	8.57	4.74	5.49	2.51	nd	0.06	0.04
Mac 6	vg/dg	0.31	0.10	0.262*	NA	0.76	0.04	22.41	0.04	0.11	27,7*	NA	NA
	RQ	0.02	nd	nd		0.41	0.51	0.99	0.34	0.23	1,8*		
Mac 7	vg/dg	100.00	0.95	1.43	8.42	Site#1 0.30 Site#2 0.51 Site#3 0.18 Site#4 0.49 Site#5 0.15	0.03	0.06	0.03	0.05	0,36	2.85	0.23
	RQ	0.02	0.01	0.00	0.05	Site#1 0.06 Site#2 0.15 Site#3 0.01 Site#4 0.01 Site#5 0.08	0.13	1.86	0.18	0.12	nd	0.02	0.007

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif du nombre de copies de vecteur et de transcrit de génome viral détectés dans les tissus des primates injectés.** L'analyse précoce a été réalisée sur des biopsies de ganglions lymphatiques à J7 post-injection, des prélèvements de rate et des biopsies hépatiques à J60 sauf pour Mac 6 où les rate et foie ont été collectés à J30 (\*). L'analyse à long terme a été réalisée sur des prélèvements obtenus soit i) par des biopsies de muscles prélevées à 8,5 mois, 6,5 mois et 8 mois pour Mac 1, 2 et 3 respectivement ou ii) lors de prélèvements post-mortem chez Mac 4, 5 et 7 qui ont été euthanasiés un an post-injection et chez Mac 6 qui a été euthanasié à J30 post-injection. Le nombre de génomes viraux a été analysé par qPCR et est exprimé en copies de génome viral par génome diploïde (vg/dg), les transcrits ont été analysés par RT-PCR quantitative et sont exprimés en quantité relative (RQ). nd : non détecté, NA : non applicable

## **b) Détection d'une réponse immune humorale et cellulaire spécifique bien que l'expression du transgène soit maintenue**

L'analyse de l'expression de la protéine GFP dans le membre injecté a montré une persistance de l'expression du transgène jusqu'à au moins huit mois post-injection. Dans les études précédentes, ce mode d'administration avait déjà permis une expression du transgène à long terme sans induire de réponse immune cellulaire cytotoxique (Toromanoff et al. 2010 ; Haurigot et al. 2010). Nous avons donc également étudié la réponse immune dans notre modèle, qu'elle soit dirigée contre la capsidie et/ou le transgène. Pour cela, la présence d'anticorps de type IgG dirigés contre la capsidie de l'AAV8 et contre la protéine GFP a été recherchée par ELISA au même titre que la réponse cellulaire envers la capsidie de l'AAV8 et le produit du transgène par ELISpot.

De manière non-surprenante, après injection, tous les primates ont développé des facteurs neutralisants ainsi que des IgG dirigées contre la capsidie de l'AAV8 (**Tableau 6**). Il est à rappeler que les animaux inclus dans l'étude ne présentaient pas de facteurs neutralisants ni d'IgG dirigés contre l'AAV de sérotype 8 avant injection. Pour les anticorps, une cinétique réalisée entre 3 et 90 jours montrent que les IgG sont détectables entre 3 (Mac 3) et 15 jours (Mac 6) après administration du vecteur et jusqu'à au moins 90 jours sans diminution des titres à ce point.

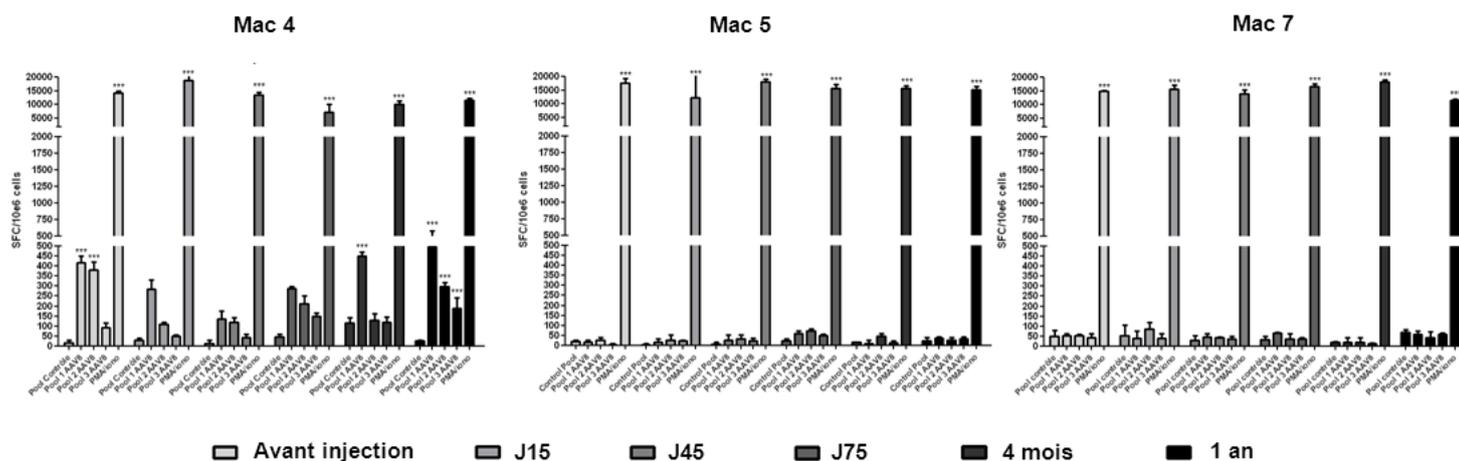
La réponse cellulaire dirigée contre la capsidie de l'AAV8 a également été mesurée à travers la sécrétion d'IFN $\gamma$ . Pour cela, les PBMC de primates collectés à différents temps (avant injection puis entre J15 et un an post-injection) ont été restimulés *in vitro* à l'aide d'une banque de peptides recouvrant la totalité de la séquence VP1 de la capsidie de l'AAV8. Ces peptides de 15 acides aminés chevauchant sur 10 ont été regroupés en trois pools. Les contrôles négatifs ont consisté en des PBMC non activés cultivés dans du milieu seul (résultats non présentés) ainsi qu'une stimulation des cellules avec un pool de peptides ne correspondant à aucun antigène connu chez le primate. Le contrôle positif a consisté à stimuler les cellules avec de la PMA/iono. Chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7), la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les PBMC restimulés a été détectée chez un seul animal (Mac 4) aussi bien avant injection qu'à quatre mois et un an post-injection (**Figure 25**). Cette réponse ne semble cependant pas avoir d'impact sur

l'expression du transgène comme cela a pu être décrit chez l'Homme lors de la réactivation de cellules mémoires spécifiques de l'AAV après transfert de gène (Mingozzi et al. 2007a ; Mingozzi et al. 2009).

	IgG anti-AAV									NAF	
	J0	J3	J7	J15	J30	J45	J60	J75	J90	Avant injection	Après injection
<b>Mac 1</b>	nd	nd	nd	1:160	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	nd	1:1000
<b>Mac 2</b>	nd	nd	1:80	1:5120	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	nd	1:5000
<b>Mac 3</b>	nd	1:80	1:1280	1:10240	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	>1:20480	nd	1:5000
<b>Mac 4</b>	nd	nd	1:640	1:327680	1:10240	>327680	>327680	>327680	>327680	nd	1:1000
<b>Mac 5</b>	nd	nd	1:160	1:5120	1:10240	>327680	>327680	>327680	>327680	nd	1:5000
<b>Mac 6</b>	nd	nd	nd	1:10240	1:20480	NA	NA	NA	NA	nd	1:1000
<b>Mac 7</b>	nd	NA	1:1280	1:10240	1:10240	1:2560	1:10240	1:5120	1:1280	nd	1:100

**Tableau 6 : Détection d'anticorps et de facteurs neutralisants dirigés contre la capsid de l'AAV8.** La présence d'anticorps anti-AAV8 a été recherchée dans les sérums de primates collectés avant injection, à J3, J7, J15, J30, J45, J60, J75 et J90 post-injection. Tous les échantillons ont été testés en duplicat. Le titre en anticorps correspond à la dernière dilution où la valeur de densité optique (DO) est supérieure à la moyenne des DO d'échantillons témoins (n=29) à la même dilution  $\pm$  2SD. La présence de facteurs neutralisants (NAF) a été analysée avant et après injection (J60 pour Mac 1-3, 4-5 et 7 et J30 pour Mac 6). Le titre correspond à la dilution la plus forte à laquelle la transduction de l'AAV est inhibée à 100%. nd : non détecté, NA : non applicable

La réponse immune dirigée contre le produit du transgène a également été analysée chez ces animaux. Pour cela, la présence d'IgG anti-GFP a été recherchée dans le sérum des animaux avant injection, puis entre 3 et 90 jours post-injection. Les résultats montrent que les anticorps dirigés contre la protéine GFP qui, comme attendu, n'étaient pas détectables avant injection, apparaissent entre 3 (Mac 3, 4, 5 et 6) et 15 jours (Mac 2) après l'injection quels que soient le vecteur ou le mode d'administration. Ces anticorps sont détectés jusqu'à 90 jours post-injection et les titres en anticorps sont supérieurs à la plus forte dilution qui est de 1/327680 dès J15 pour tous les animaux (**Figure 26A**).



**Figure 25 : Analyse cinétique de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les PBMC circulants en réponse aux peptides dérivés de l'AAV8 des primates injectés avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7).** Les PBMC ont été collectés avant injection, à J15, J45, J75, 4 mois et un an post-injection. Les cellules ont été restimulées *in vitro* par une banque de peptides recouvrant la séquence VP1 de la capsid de l'AAV8. Ces peptides de 15 acides aminés chevauchant sur 10 ont été regroupés en 3 pools (Pool 1 à 3). Le contrôle positif consiste à restimuler les splénocytes à l'aide d'un agent mitogène : la PMA/ionomycine. Le contrôle négatif consiste en une restimulation des cellules à l'aide d'un pool de peptides ne codant pour aucun antigène connu chez le primate. Les réponses sont exprimées en SFC (Spot Forming Colony) par  $10^6$  cellules. Elles sont considérées comme positives quand le nombre de SFC/ $10^6$  cellules est supérieur à 50 et au moins 3 fois supérieur au nombre de spots détectés avec la condition pool contrôle. Les résultats sont exprimés en SFC/ $10^6$  cellules. Test DFR, \*\*\* :  $p < 0,001$

De manière étonnante, l'expression de la GFP est maintenue à long terme chez nos animaux injectés par voie LR malgré la présence d'une forte réponse humorale dirigée contre le produit du transgène. Nous avons donc voulu étudié la présence d'une réponse cellulaire dirigée contre la protéine GFP par ELISpot à travers la sécrétion d'IFN $\gamma$  dans un premier temps. Pour cela, les splénocytes des primates ont été isolés à J60 post-injection et restimulés *in vitro* à l'aide d'une banque de peptides recouvrant la totalité de la séquence codant pour la protéine GFP. Ces peptides de 15 acides aminés chevauchant sur 10 ont été regroupés en cinq pools. Les contrôles négatifs ont consisté en des splénocytes non activés cultivés dans du milieu seul (résultats non présentés) ainsi qu'une stimulation des cellules avec un pool de peptides ne correspondant à aucun antigène connu chez le primate. Le contrôle positif a consisté à stimuler les cellules avec de la PMA/iono. La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les splénocytes restimulés a été détectée chez tous les animaux injectés : aussi bien chez les animaux injectés avec le scAAV8-Des-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) qu'avec le scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4, 5) ou IM (Mac 7) (**Figure 26B** et **Tableau 7**). En effet, Mac 1, 2, 3, 4 et 7 présentaient une réponse contre le pool de peptide 2 : entre 83 SFC/ $10^6$  cellules pour Mac 2 et

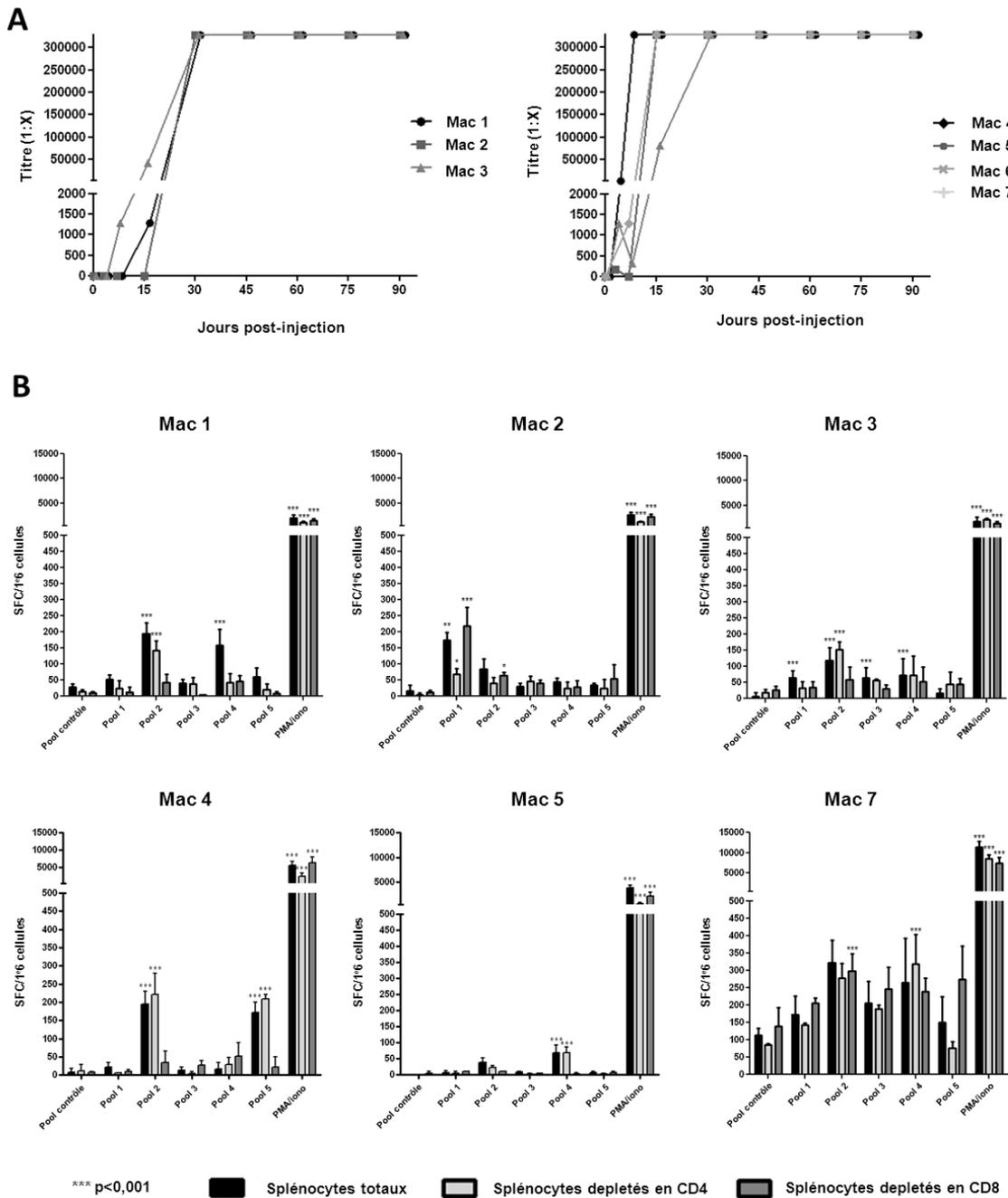
323 SFC/10<sup>6</sup> cellules pour Mac 7. Ces résultats suggèrent que quel que soit le mode d'administration du vecteur, une réponse spécifique des LT contre la protéine GFP est induite. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés à partir de PBMC collectés à différents temps post-injection chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP. La sécrétion d'IFN $\gamma$  est détectée à partir de J45 et jusqu'à l'euthanasie à un an post-injection (**Figure 27**).

	cellules	pool contrôle	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	PMA/iono	
IFN $\gamma$	Splénocytes	28	52	195	40	158	60	2100	
	Splénocytes déplétés en CD4	15	25	143	38	42	20	1227	
	Splénocytes déplétés en CD8	10	13	43	5	47	8	1587	
	Mac 2	Splénocytes	17	173	83	30	43	33	2740
		Splénocytes déplétés en CD4	5	68	40	47	23	25	1280
		Splénocytes déplétés en CD8	12	218	65	40	28	53	2300
	Mac 3	Splénocytes	7	65	118	65	73	17	1820
		Splénocytes déplétés en CD4	18	32	153	57	72	45	2167
		Splénocytes déplétés en CD8	13	17	40	13	45	18	423
	Mac 4	Splénocytes	6	21	195	13	16	171	5666
		Splénocytes déplétés en CD4	11	5	221	3	28	208	2516
		Splénocytes déplétés en CD8	6	10	33	26	51	21	6400
	Mac 5	Splénocytes	0	6	38	8	68	6	3850
		Splénocytes déplétés en CD4	0	5	21	1	68	1	733
		Splénocytes déplétés en CD8	5	10	10	5	3	6	2200
	Mac 7	Splénocytes	113	173	323	205	265	150	11300
		Splénocytes déplétés en CD4	85	143	278	188	318	76	8550
		Splénocytes déplétés en CD8	138	205	298	246	238	275	7450

**Tableau 7 : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IFN $\gamma$  de splénocytes totaux ou déplétés après restimulation.** Les tests ELISpot ont été réalisés à partir de splénocytes isolés à J60 post-injection. Les résultats sont exprimés en nombre de spots par million de cellules (SFC/10<sup>6</sup> cellules). Les cellules grisées correspondent aux valeurs dont la p-value < 0,001 par rapport témoin négatif.

Afin de caractériser la réponse lymphocytaire, des déplétions ont été réalisées à partir des splénocytes. Pour déterminer si cette réponse était due à la restimulation de LT CD4, les splénocytes ont été déplétés en LT CD8 à l'aide d'un aimant magnétique. A l'inverse, les splénocytes ont été déplétés en LT CD4 de manière à mesurer la réponse des LT CD8 (**Figure 26B**). Les résultats montrent que chez les primates injectés par voie LR, la sécrétion d'IFN $\gamma$  est médiée par les LT CD8 (Mac 1, 3, 4, 5) sauf pour Mac 2. Par contre, pour le primate

injecté par voie IM (Mac 7) la sécrétion est médiée à la fois par les LT CD8 et les LT CD4. Il est à noter qu'un des primates injecté par voie LR présente un profil différent. En effet, Mac 2

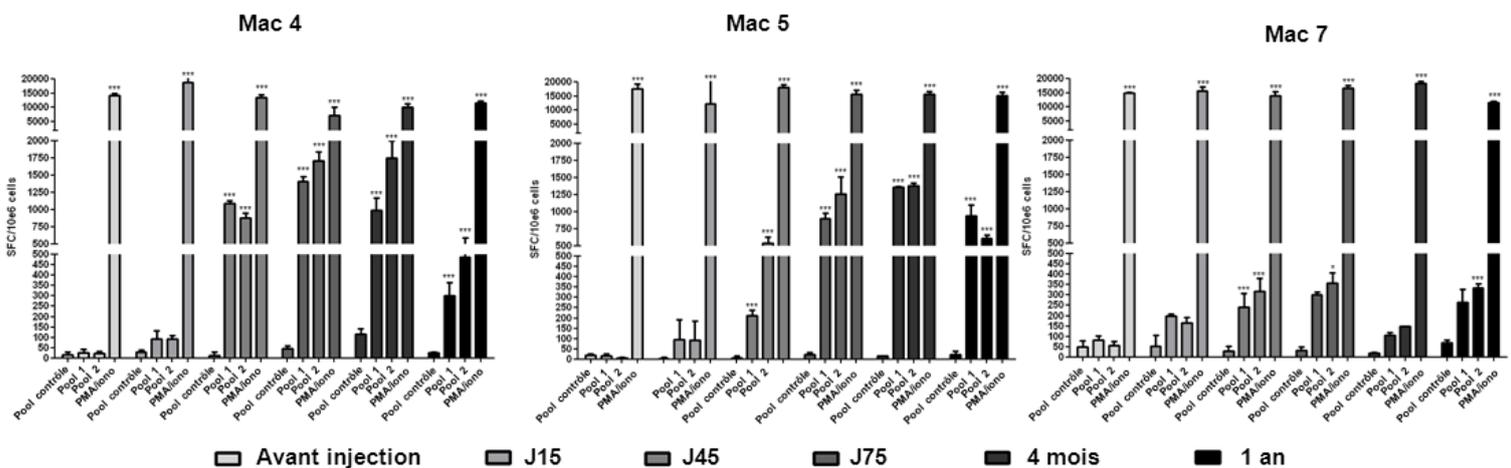


**Figure 26 : Réponse immunitaire adaptative dirigée contre la protéine GFP après injection du vecteur par voie LR ou IM.** **A**) La recherche d'anticorps anti-GFP a été réalisée par ELISA dans les sérums de primates prélevés avant injection (J0) puis à J3, J7, J15, J30, J45, J60, J75 et J90 post-injection. Tous les échantillons ont été testés en duplicat. Le titre en anticorps correspond à la dernière dilution où la valeur de densité optique (DO) est supérieure à la moyenne des DO d'échantillons témoins (n=22) à la même dilution  $\pm$  2SD. **B**) Sécrétion d'IFN $\gamma$  mesurée par un test ELISpot après la restimulation de splénocytes *in vitro*. Les splénocytes ont été isolés à J60 post-injection et restimulés *in vitro* à l'aide d'une banque de peptides recouvrant la séquence codant pour la protéine GFP. Ces peptides de 15 acides aminés chevauchant sur 10 ont été regroupés en cinq pools (Pool 1 à 5). Les contrôles positif et négatif ainsi que la méthode de détermination du seuil de positivité sont décrits en figure

25. La sécrétion d'IFN $\gamma$  a été mesurée à partir de splénocytes totaux (noir), de splénocytes déplétés en LT CD4 (gris clair) et de splénocytes déplétés en LT CD8 (gris foncé). Test DFR, \*\*\* : p<0,001

présente un profil de sécrétion d'IFN $\gamma$  comparable à Mac 7. Enfin, une double déplétion de splénocytes en LT CD4 et LT CD8 a été effectuée pour vérifier que la sécrétion d'IFN $\gamma$  était bien due à ces populations de LT. Les résultats ont montré qu'en l'absence de LT CD4 et de LT CD8, l'IFN $\gamma$  n'était pas détecté (résultats non-présentés).

Nos résultats montrent donc qu'après une injection par voie LR d'un vecteur codant pour la protéine GFP, des anticorps anti-GFP sont détectés ainsi qu'une réponse cellulaire caractérisée par la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les LT. Cependant, la réponse lymphocytaire n'est pas médiée par les mêmes populations selon la voie d'administration. Nous avons donc voulu étudier en plus de l'IFN $\gamma$ , la sécrétion d'IL-2 et d'IL-10 par ces cellules.



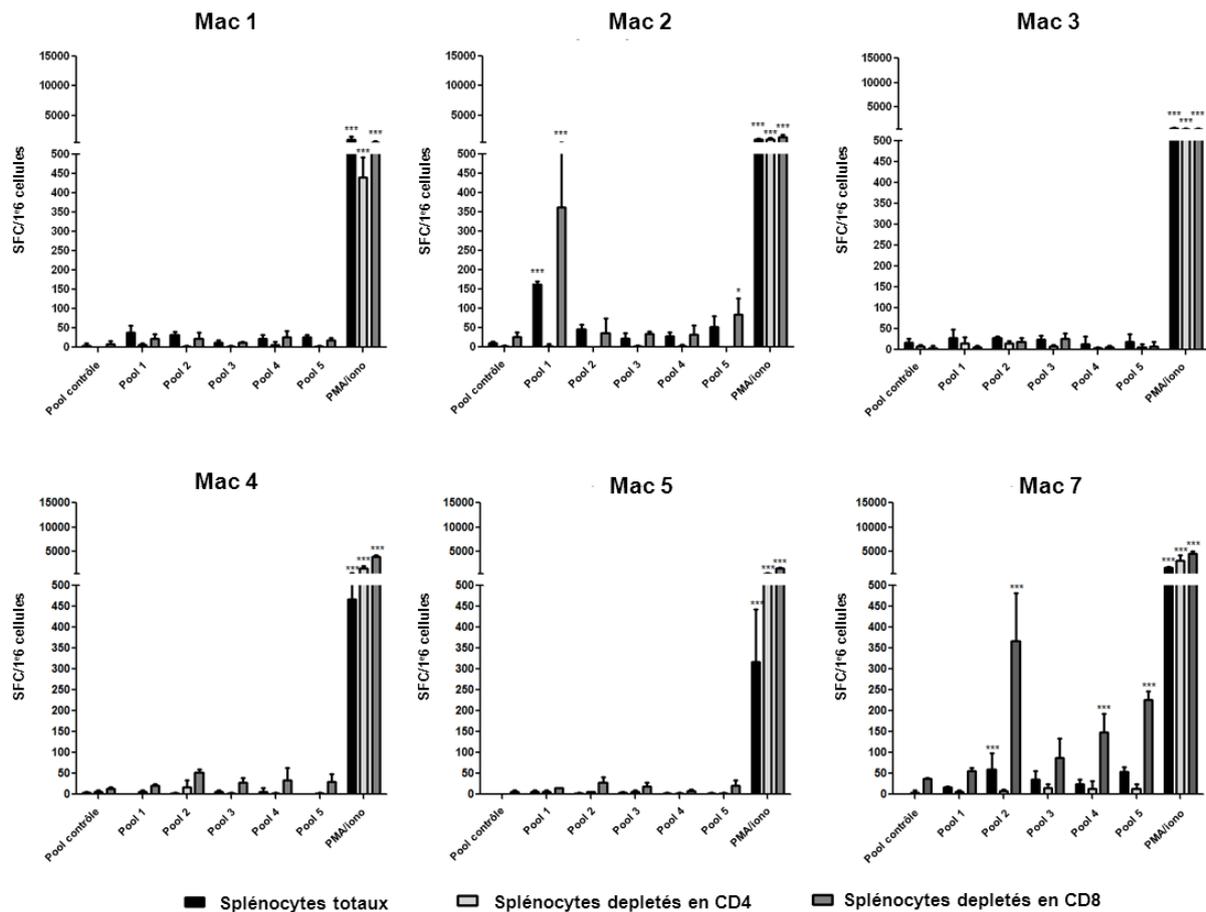
**Figure 27 : Analyse cinétique de la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les PBMC circulants en réponse aux peptides dérivés de la GFP des primates injectés avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7).** Les PBMC ont été collectés avant injection, à J15, J45, J75, 4 mois et un an post-injection. Les cellules ont été restimulées *in vitro* par une banque de peptides recouvrant la séquence codant pour la protéine GFP. Ces peptides de 15 acides aminés chevauchant sur 10 ont été regroupés en deux pools (Pool 1 et 2). Les contrôles positif et négatif ainsi que la méthode de détermination du seuil de positivité sont décrits en figure 25. Les résultats sont exprimés en SFC/10<sup>6</sup> cellules. Test DFR, \*\*\* : p<0,001

### c) Caractérisation de la réponse cellulaire spécifique du transgène

Dans le but de mieux caractériser cette réponse cellulaire dirigée contre le produit du transgène, la sécrétion d'IL2 a été analysée comme précédemment par ELISpot. Pour cela, les splénocytes totaux, déplétés en LT CD4 ou déplétés en LT CD8 ont été restimulés *in vitro* à l'aide de la banque de peptides spécifique de la protéine GFP. Chez les primates injectés par voie LR, aucune sécrétion d'IL2 n'a été détectée lors de la restimulation des cellules avec les pools de peptides dérivés de la GFP que ce soit pour les splénocytes totaux ou pour les fractions déplétées en LT CD4 ou LT CD8 excepté pour Mac 2 qui présentait déjà un profil différent en IFN $\gamma$  (**Figure 28 et Tableau 8**). Le primate injecté par voie IM présente quant à lui une réponse IL2 médiée par les splénocytes et plus précisément par les LT CD4 en réponse aux pools 2, 4 et 5 (366, 148 et 226 SFC/10<sup>6</sup> cellules respectivement) suggérant la présence d'une réponse de type Th1 puisque ces cellules sécrétaient également de l'IFN $\gamma$ . Cependant, la caractérisation de la réponse cellulaire devra être complétée (sécrétion de TNF $\alpha$ ) pour s'assurer de cette hypothèse.

	cellules	pool contrôle	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	PMA/iono	
IL2	Mac 1	Splénocytes	5	38	33	12	22	27	1090
		Splénocytes déplétés en CD4	0	7	2	2	7	2	440
		Splénocytes déplétés en CD8	8	22	23	12	27	18	580
	Mac 2	Splénocytes	10	163	47	23	28	52	1040
		Splénocytes déplétés en CD4	2	3	0	2	3	0	1067
		Splénocytes déplétés en CD8	27	362	37	35	33	85	1420
	Mac 3	Splénocytes	17	28	28	25	13	18	667
		Splénocytes déplétés en CD4	8	15	15	8	3	7	520
		Splénocytes déplétés en CD8	3	5	18	27	5	8	513
	Mac 4	Splénocytes	3	0	1	5	6	0	466
		Splénocytes déplétés en CD4	5	5	16	1	1	1	1650
		Splénocytes déplétés en CD8	13	20	51	28	33	30	3966
	Mac 5	Splénocytes	0	6	1	3	1	1	316
		Splénocytes déplétés en CD4	0	5	5	5	1	1	600
		Splénocytes déplétés en CD8	5	15	28	18	8	20	1550
	Mac 7	Splénocytes	0	16	60	35	25	53	1850
		Splénocytes déplétés en CD4	3	5	8	15	13	13	3183
		Splénocytes déplétés en CD8	36	55	366	86	148	226	4600

**Tableau 8 : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IL-2 par les splénocytes totaux ou déplétés après restimulation.** Les tests ELISpot ont été réalisés à partir de splénocytes isolés à J60 post-injection. Les résultats sont exprimés en nombre de spots par million de cellules (SFC/10<sup>6</sup> cellules). Les cellules grisées correspondent à des valeurs dont la p-value < 0,001 par rapport au témoin négatif.



**Figure 28 : Sécrétion d'IL2 mesurée par un test ELISpot après la restimulation de splénocytes *in vitro*.** Les splénocytes ont été isolés à J60 post-injection et restimulés *in vitro* à l'aide d'une banque de peptides recouvrant la séquence codant pour la protéine GFP. Les contrôles positif et négatif ainsi que la méthode de détermination du seuil de positivité sont décrits en figure 25. La sécrétion d'IL2 a été mesurée à partir de splénocytes totaux (noir), de splénocytes déplétés en LT CD4 (gris clair) et de splénocytes déplétés en LT CD8 (gris foncé). \*\*\* :  $p < 0,001$

Ces résultats suggèrent que la réponse immune cellulaire induite après injection par voie LR d'un scAAV8 codant pour la protéine GFP n'est pas une réponse qu'on pourrait caractériser de réponse effectrice « conventionnelle ».

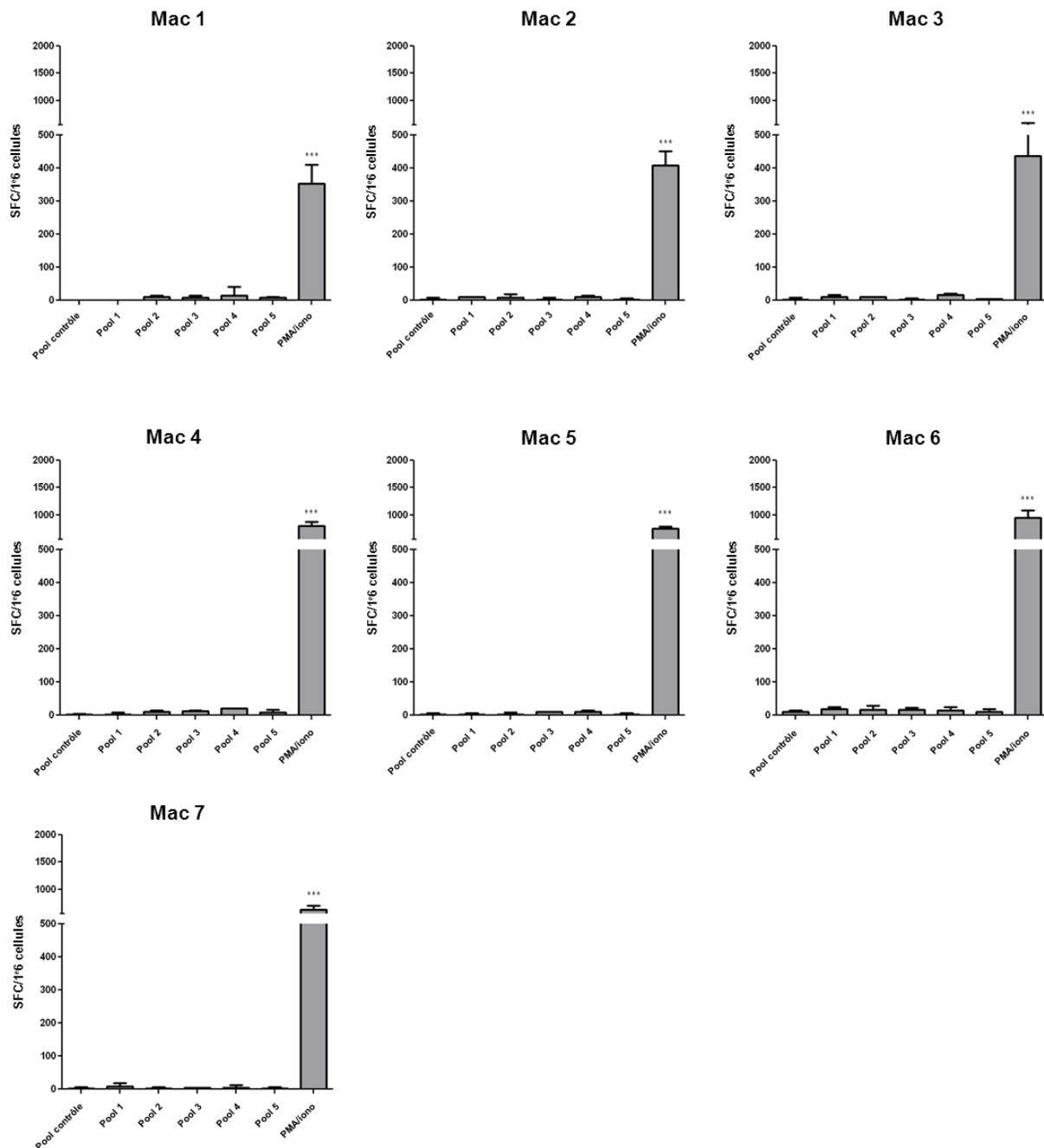
Dans le but de documenter si cette réponse lymphocytaire dirigée contre le produit du transgène dans le groupe injecté par voie LR peut être de type tolérogène comme cela a été décrit par V Haurigot (Haurigot et al 2010) dans un modèle canin, nous avons analysé la sécrétion d'IL-10 toujours par ELISpot mais à partir de PBMC cette fois. En effet, les tests précédents ont été réalisés à l'aide de splénocytes car un nombre important de cellules était

nécessaire pour réaliser les déplétions cellulaires. De plus, la restimulation de splénocytes décongelés *in vitro* pour mesurer la sécrétion d'IL-10 n'était pas concluante car la sécrétion d'IL10 après restimulation avec la PMA/ionomycine (contrôle positif) n'était pas significative. A l'inverse, la stimulation de PBMC avec la PMA/ionomycine nous permettait d'obtenir un nombre de spots significatifs par rapport au témoin négatif (**Figure 29 et Tableau 9**). Nos résultats suggèrent que la restimulation des PBMC à l'aide des pools de peptides ne permet pas de détecter une réponse significative d'IL10 par rapport à la condition contrôle chez les primates injectés par voie LR (Mac 1 à 6). Les PBMC du primate injecté par voie IM (Mac 7) ne présentaient pas non plus de sécrétion d'IL10.

La caractérisation de la réponse immune cellulaire suggère que l'administration par voie LR d'un vecteur scAAV8 codant pour la protéine GFP, quel que soit le promoteur utilisé, n'induit pas une réponse cellulaire effectrice délétère vis-à-vis du transgène. Par ailleurs, cette réponse ne semble pas être caractéristique d'une réponse tolérogénique médiée par l'IL10.

	pool contrôle	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	PMA/iono
<b>Mac 1</b>	0	0	10	8	15	7	353
<b>Mac 2</b>	3	10	8	3	10	3	408
<b>Mac 3</b>	3	10	10	2	17	5	438
<b>IL-10</b>							
<b>Mac 4</b>	1	3	10	11	20	8	801
<b>Mac 5</b>	3	2	3	10	10	2	748
<b>Mac 6</b>	10	18	16	16	15	10	950
<b>Mac 7</b>	2	7	2	5	5	2	630

**Tableau 9 : Nombre de spots détecté par ELISpot et représentant la sécrétion d'IL-10 de PBMC après restimulation.** Les tests ELISpot ont été réalisés à partir de PBMC isolés à J90 post-injection. Les résultats sont exprimés en nombre de spots par million de cellules (SFC/10<sup>6</sup> cellules). Les cellules grisées correspondent à des valeurs dont la p-value<0,001 par rapport au témoin négatif.



**Figure 29 : Sécration d'IL10 mesurée par un test ELISpot après la restimulation de PBMC *in vitro*.** Les PBMC ont été collectés à J90 post-injection et restimulés *in vitro* à l'aide d'une banque de peptides recouvrant la séquence codant pour la protéine GFP. Les témoins positif et négatif ainsi que la méthode de détermination du seuil de positivité sont décrits en figure 25. Test DFR, \*\*\* :  $p < 0,001$

De manière à compléter la caractérisation de la réponse cellulaire induite par l'injection par voie LR de vecteur chez nos primates, nous avons analysé la fréquence des cellules NK, LT et Treg circulantes avant et après le transfert de gène (cinétique de J15 à un an post-injection) par cytométrie en flux (**Figure 30 A-F**). Le ratio LT CD4/LT CD8 a

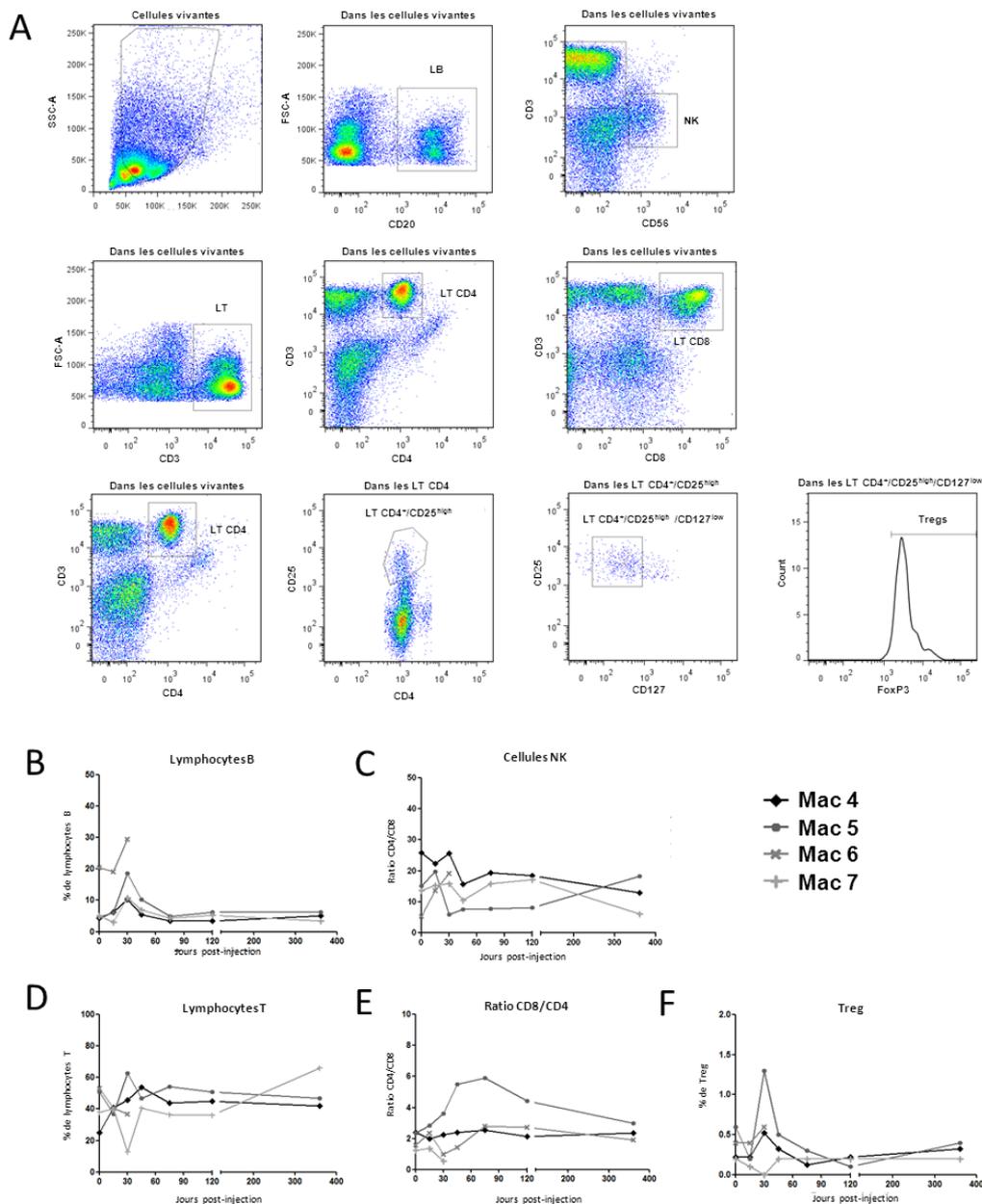
également été étudié. A ce jour, ces analyses n'ont été effectuées que chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR et IM (Mac 4 à 7). L'analyse de la fréquence de ces populations ne montrait pas de variation notable au cours du protocole pour les NK, les LT et le ratio LT CD4/LT CD8. Le pourcentage de LB semble augmenter autour de J30 post-injection chez tous les primates : de 4,3 à 10,2 %, de 4 à 18,5%, de 18,8 à 29,5 % et de 4,5 à 10,4% pour Mac 4, 5, 6 et 7 respectivement. Il est cependant difficile de déterminer si cette augmentation est significative et si elle a un lien ou un impact quelconque sur la réponse des animaux vis-à-vis de la GFP. Enfin, le pourcentage de Treg caractérisés par les marqueurs  $CD4^+/CD25^{high}/CD127^{low}/Foxp3^+$  a aussi montré une légère augmentation à 30 jours post-injection chez Mac 4, 5 et 6 comparé au pourcentage observé avant l'injection du vecteur : 0,5% contre 0,2%, 1,3% contre 0,4% et 0,6% contre 0,3 % pour Mac 4, 5 et 6 respectivement alors que Mac 7 présente entre 0,1 et 0,2% de Treg tout au long de la cinétique. Nous ne pouvons cependant pas conclure formellement sur la significativité de ces résultats car ils ne concernent que trois animaux. De plus, ils ne donnent aucune information quant à la spécificité des Treg détectés.

En conclusion, l'analyse de la réponse immune chez nos animaux montre que, bien que l'expression de la GFP soit maintenue après administration du vecteur par voie LR, une réponse immune spécifique du produit du transgène est détectée. Nous avons donc voulu vérifier si les LT spécifiques ainsi caractérisés étaient fonctionnels en analysant leur capacité à s'infiltrer dans les muscles du membre injecté. Pour cela, la structure du muscle a été analysée à l'aide d'une coloration HES et les infiltrats cellulaires ont été caractérisés.

#### **d) Détection d'infiltrats musculaires après injection par voie LR**

A 7 jours post-injection, aucun infiltrat musculaire n'a été observée chez les 7 primates de l'étude (résultats non-présentés). Par contre, à des temps plus tardifs, des infiltrats de cellules mononucléées ont été observés chez les tous primates. Ils étaient cependant

différents entre les primates injectés par voie LR (Mac 1-5) et celui injecté par voie IM (Mac 7) (Figure 31).

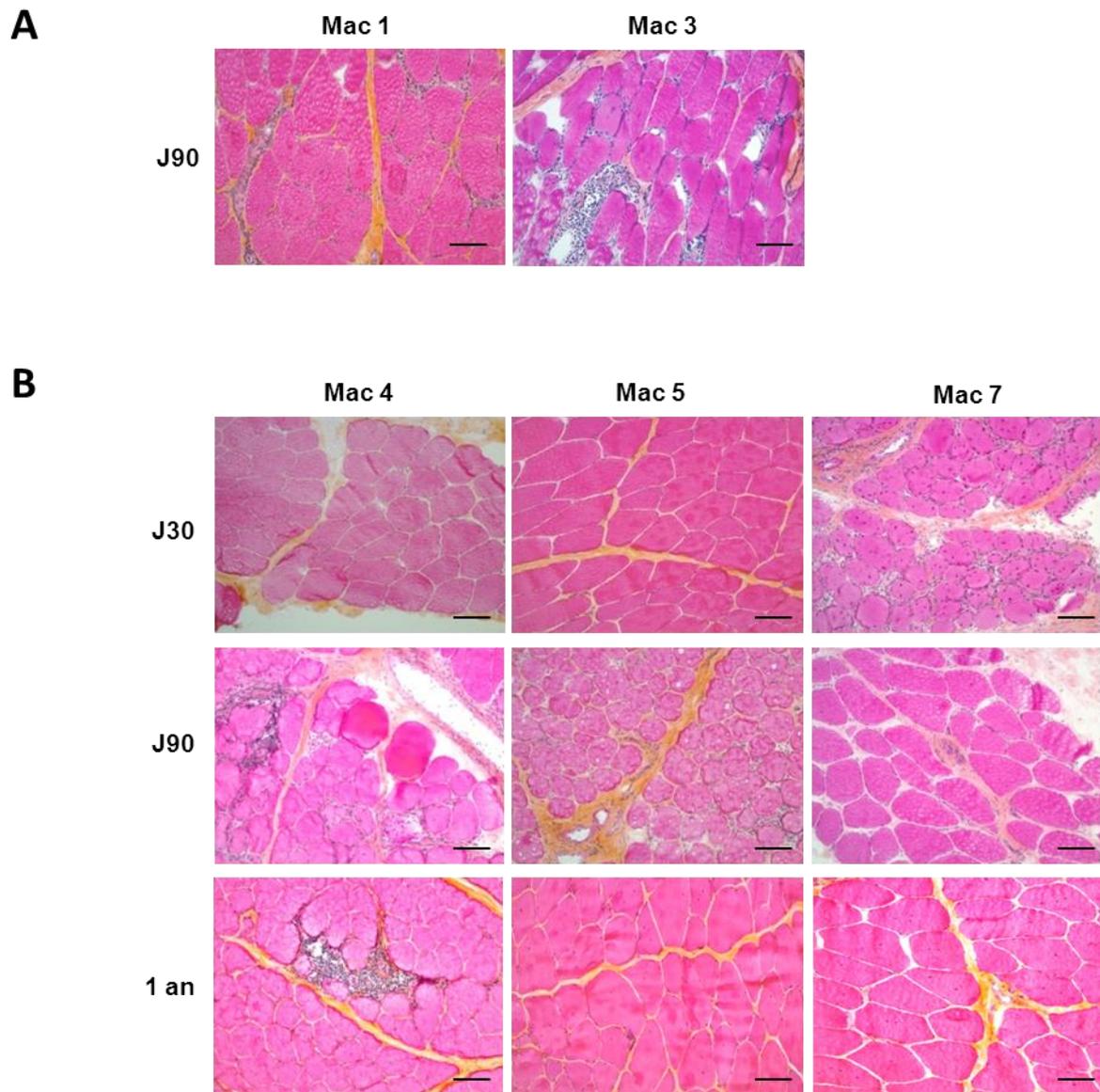


**Figure 30 : Pourcentage de LB, cellules NK, LT et Treg dans la circulation au cours du temps.** L'analyse de ces populations a été réalisée à partir de PBMC collectés à différents temps post-injection. **A)** Stratégie de marquage des populations d'intérêt. Les LB sont caractérisés par l'expression du marqueur CD20, les NK par le CD56, les LT par le CD3, les LT CD4 par les marqueurs CD3 et CD4, les LT CD8 par les marqueurs CD3 et CD8 et les Treg par les marqueurs CD4, CD25, CD127 et Foxp3. **B)** pourcentage de LB, **C)** pourcentage de NK, **D)** pourcentage de LT, **E)** ratio LT CD8/LT C4 et **F)** pourcentage de Treg au cours du temps.

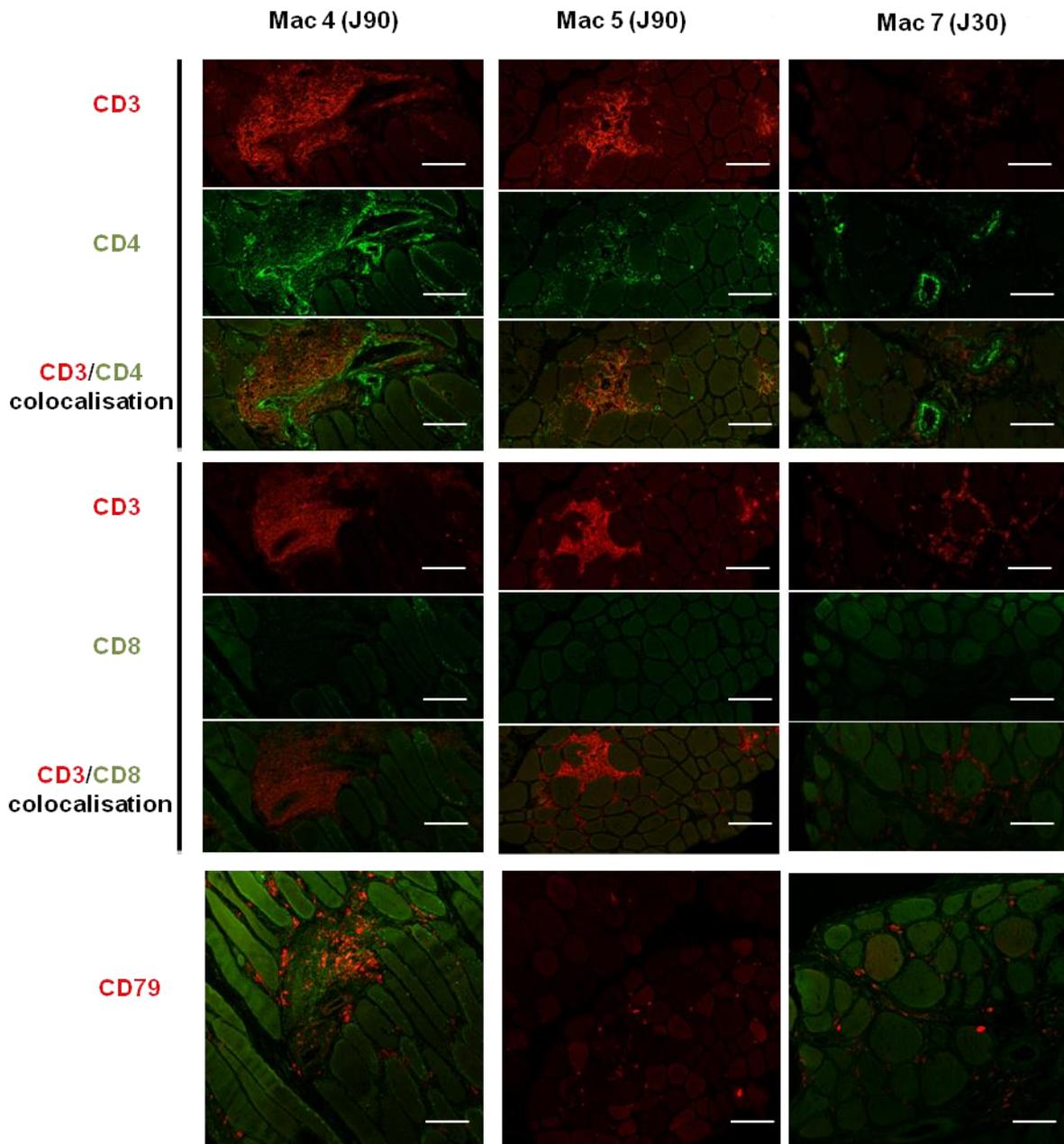
Le muscle injecté chez le primate IM (Mac 7) montrait une inflammation sévère à J30 post-injection, l'infiltration de cellules était diffuse et généralisée en position endomysiale (**Figure 31B**). Ces infiltrats cellulaires étaient associés à des lésions nécrotiques secondaires de fibres musculaires, quoique peu marquées. A plus long terme (8 mois et un an post-injection), les infiltrats n'étaient plus détectés dans le muscle injecté. La présence de ces infiltrats entre J30 et J90 post-injection corrèle donc avec la perte d'expression de la GFP aux sites d'injection. Par ailleurs, la caractérisation de ces cellules infiltrées à J30 a montré qu'elles étaient principalement constituées de LT CD4 mais aussi de LB (CD79) (**Figure 32**). En revanche et de manière inattendue, nous n'avons pas détecté de LT CD8, ce qui suggère de nouveau que la perte de l'expression de la GFP après injection IM est due (au moins en partie) à d'autres mécanismes comme une régulation de l'expression du transgène. La recherche d'autres mécanismes de lyse des cellules transduites (comme les cellules NK ou le complexe d'attaque membranaire) devra aussi être réalisée pour compléter l'analyse.

Concernant les primates injectés par voie LR, des infiltrats cellulaires étaient également observés dans les muscles perfusés des primates injectés avec le scAAV8-CMV-GFP (Mac 4 et 5) et avec le scAAV8-Des-GFP (Mac 1 et Mac 3) (**Figure 31 A-B**). Il est à noter cependant que la fréquence des infiltrats dans le groupe desmine semble plus faible que pour le CMV (résultats non-présentés), suggérant un effet du promoteur. (**Figure 31 A-B**). A la différence du primate injecté par voie IM, les primates injectés par voie LR ont montré des infiltrats musculaires plus localisés, avec des plages restreintes en positions pérимysiale et endomysiale. Ces infiltrats qui n'étaient pas associés à une atteinte nécrotique ont été observés entre J30 ou J90 mais étaient maintenus à plus long terme (jusqu'à un an post-injection pour Mac 4 et 5) (**Figure 31B**).

La caractérisation de ces cellules à J90 a montré que les infiltrats étaient principalement composés de LT CD4 mais aussi de LB (CD79) chez les deux primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP (Mac 4 et 5). Des LT CD8 n'ont pas été détectés, confirmant ainsi l'absence de cytotoxicité. A ce jour, la caractérisation des infiltrats n'a pas encore été réalisée chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP.



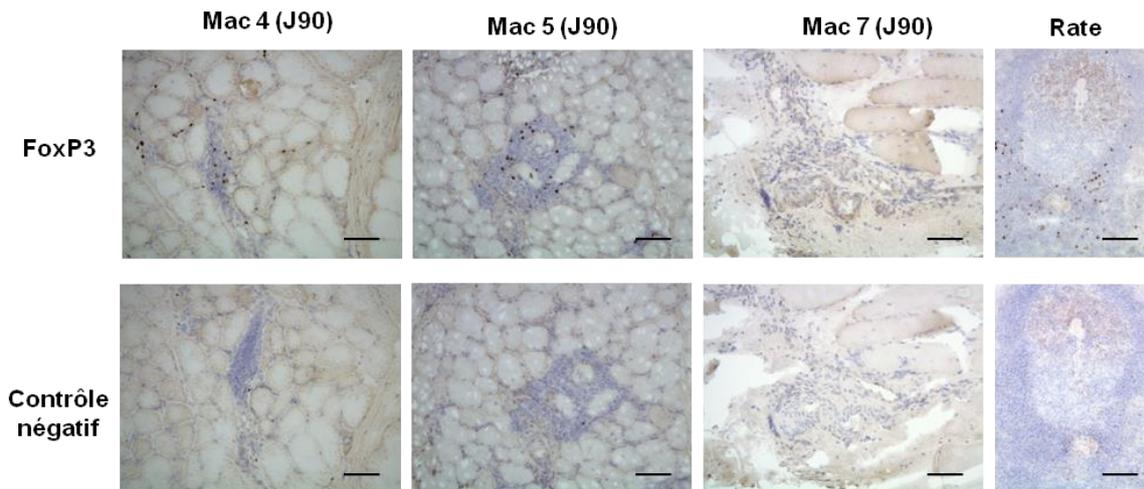
**Figure 31 : Détection d'infiltrats musculaires dans le membre injecté des primates injectés par voie LR ou IM. A)** Les primates ont été injectés dans le membre postérieur avec un vecteur scAAV8-Des-GFP par voie LR. Les biopsies musculaires ont été réalisées dans le biceps fémoral (Mac 1 et 3) à J90 après l'injection. Les observations histologiques ont été effectuées à l'aide d'une coloration HES. **B)** Les primates ont été injectés dans le membre postérieur avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR. Les biopsies musculaires ont été réalisées dans le tibial antérieur à J30, J90 et 8 mois après l'injection. Les observations histologiques ont été effectuées à l'aide d'une coloration HES. Echelle : 100µm.



**Figure 32 : Caractérisation des infiltrats musculaires détectés chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR ou IM.** Les infiltrats cellulaires ont été caractérisés sur des biopsies musculaires prélevés à J90 pour Mac 4 et 5 et à J30 pour Mac 7. La présence de LT CD4 (CD3 (rouge), CD4 (vert), colocalisation (jaune), de LT CD8 (CD3 (rouge), CD8 (vert), colocalisation (jaune) et de lymphocytes B (CD79 (rouge)) a été analysée par immunohistochimie. Echelle : 100µm

Enfin, nous avons voulu déterminer si les LT CD4 infiltrés détectés chez les primates injectés par voie LR pouvaient être des Treg. Pour cela, nous avons réalisé un marquage Foxp3 (**Figure 33**). Ce marquage a également été réalisé sur des coupes de rate pour constituer un contrôle positif. Le contrôle négatif correspondait quant à lui à l'incubation de

l'anticorps secondaire en l'absence d'anticorps primaire. Les résultats montrent que des cellules exprimant le Foxp3 sont présentes dans les muscles du membre injecté chez les primates injectés par voie LR (Mac 4 et 5) mais pas chez le primate injecté par voie IM (Mac 7). Ces résultats couplés à la présence de LT CD4 suggèrent donc la présence de Treg infiltrés après une injection par voie LR.



**Figure 33 : Immunomarquage Foxp3 sur les biopsies musculaires de primates injectés avec le vecteur scAAV-CMV-GFP par voie LR ou IM.** Les biopsies musculaires ont été collectées à J90 post-injection chez les primates injectés par voie LR (Mac 4 et 5) ou IM (Mac 7) avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP. L'immunomarquage Foxp3 a été réalisé sur une coupe de rate en tant que contrôle positif. Le contrôle négatif a consisté en incubation avec l'anticorps secondaire ne absence de l'anticorps primaire. Ces contrôles négatifs n'ont montré aucun signal aspécifique (ligne contrôle négatif). Echelle : 100µm

Ces résultats couplés à la caractérisation de la réponse immune cellulaire montrent que l'injection d'un vecteur par voie LR résulte en l'absence d'une immunotoxicité dirigée contre le produit du transgène. Par ailleurs, l'étude polyfonctionnelle des LT et la présence de cellules infiltrées dans le muscle, positives en Foxp3, suggèrent l'initiation d'une réponse de type anergique et/ou tolérogène pouvant être à l'origine du maintien de l'expression du transgène.

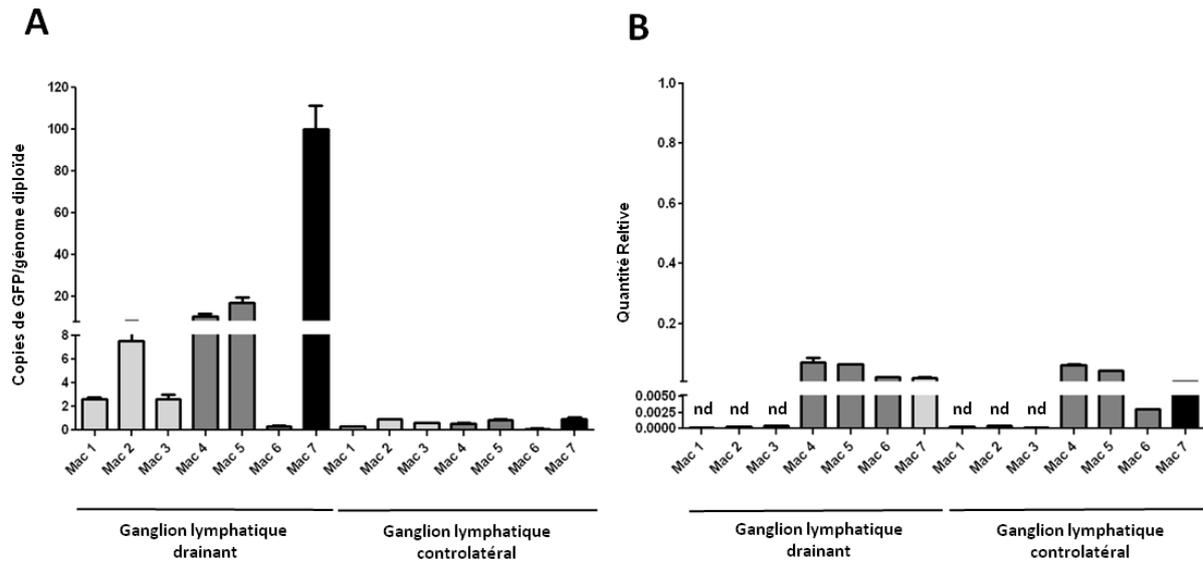
Nous avons donc voulu déterminer quels étaient les événements immunologiques précoces responsables de l'initiation de cette réponse immune non délétère après une administration du vecteur par voie LR. Notre hypothèse est que les signaux inflammatoires induits après l'injection par voie LR ne sont pas suffisamment importants pour déclencher une

réponse immunitaire destructrice à l'encontre du transgène contrairement à la voie IM. Pour le vérifier, nous avons analysé le drainage du vecteur dans les organes lymphoïdes dès 7 jours post-injection, au même titre que les cytokines inflammatoires circulantes et l'expression de gènes codant pour des chimiokines et cytokines inflammatoires *in situ*.

#### e) Drainage du vecteur dans les ganglions lymphatiques

La quantification du génome viral dans les ganglions lymphatiques drainants et non-drainants a été réalisée à J7 post-injection par qPCR (**Figure 34A et Tableau 5**). Les résultats montrent que du génome viral est détecté aussi bien dans les ganglions lymphatiques drainants que controlatéraux. Alors que le nombre de copies détecté dans les ganglions controlatéraux est comparable entre les primates injectés par voies LR (Mac 1 à 6) et IM (Mac 7), une différence est observée dans les ganglions drainants. En effet, alors que les primates injectés par voie LR présentent entre 0,2 (Mac 6) et 16 copies (Mac 5) de génome viral/génome diploïde, le primate injecté par voie IM en présente 100 (Mac 7). Cette différence entre les deux voies d'administration est d'ailleurs toujours détectable à plus d'un an post-injection (**Tableau 5**)

Par ailleurs, l'analyse transcriptionnelle de ces copies de génome viral révèle que les copies détectées dans les ganglions lymphatiques sont déjà transcrites à 7 jours post-injection sauf chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP (**Figure 34B**). Cette différence peut s'expliquer par la nature du promoteur en lui-même puisqu'il est décrit pour s'exprimer dans le muscle. De manière étonnante, la quantité relative de transcrit est comparable dans le ganglion lymphatique drainant des primates injectés par voie LR et IM avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP alors qu'une différence importante était détectée en nombre de copies par génome diploïde entre les deux groupes. De plus, la quantité relative de transcrit est comparable entre les ganglions drainants et non-drainants.



**Figure 34 : Détection de génome viral et de transcrit dans les ganglions lymphatiques à 7 jours post-injection.** Les ganglions lymphatiques inguinaux ont été collectés à J7 post-injection. **A)** Le génome viral est détecté par qPCR ciblant la séquence GFP, spécifique du génome viral. Les résultats sont exprimés en nombre de copies par génome diploïde. **B)** Détection de transcrits dans les ganglions lymphatiques drainants et controlatéraux. La présence de transcrits est analysée par RT-PCR quantitative ciblant la séquence GFP, spécifique du génome viral. Les résultats sont exprimés en quantité relative. nd : non détecté

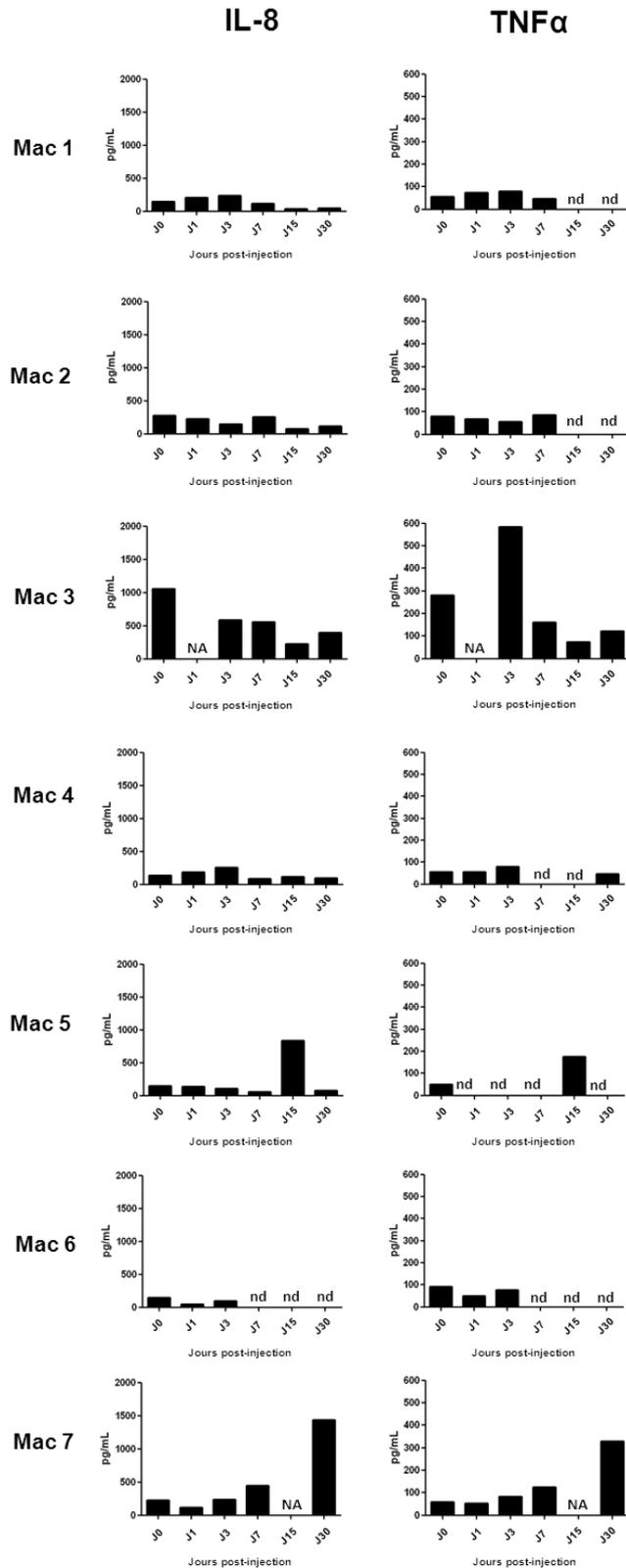
Enfin, du génome viral est détecté dans la rate et dans le foie des primates injectés aussi bien par voie LR que par voie IM (**Tableau 5**). La quantité relative de transcrit est quant à elle faible (Mac 1-3 et 7) voire non détectable (Mac 4 et 5) dans ces tissus. De plus, chez les primates présentant du transcrit, aucune différence n'est observée entre les voies LR et IM suggérant que l'absence d'immunotoxicité après administration du vecteur par voie LR n'est pas dépendante de la transduction du foie comme cela a précédemment été décrit (Mount et al. 2002 ; Mingozzi et al. 2003).

En conclusion, le nombre de copies de génome viral détecté dans le ganglion lymphatique drainant est beaucoup plus faible chez les primates injectés par voie LR par rapport au primate injecté par voie IM. Nous avons donc voulu déterminer si cette différence de drainage avait un impact sur les signaux inflammatoires et si cela pouvait expliquer le maintien de l'expression du transgène à long terme.

## f) Analyse des signaux inflammatoires dans le ganglion lymphatique et le membre injecté

La présence de cytokines inflammatoires circulantes a été recherchée dans les plasmas des animaux avant injection puis entre 3 et 30 jours après injection (**Figure 35**). Les résultats ont montré que parmi les cytokines analysées, seules les concentrations en IL-8 et TNF $\alpha$  semblent varier, avec une tendance à l'augmentation après injection chez Mac 7. Concernant les primates injectés par voie LR, la concentration ne dépassait en général pas le taux basal établi à partir du plasma avant injection. En revanche, Mac 5 a montré une augmentation en IL-8 et TNF $\alpha$  à J15 mais la concentration est revenue à un taux basal à J30 et Mac 3 a montré une augmentation de la concentration en TNF $\alpha$  uniquement à J3. Pour toutes ces raisons, nous ne pouvons malheureusement pas conclure sur la significativité ni la spécificité de ces signaux.

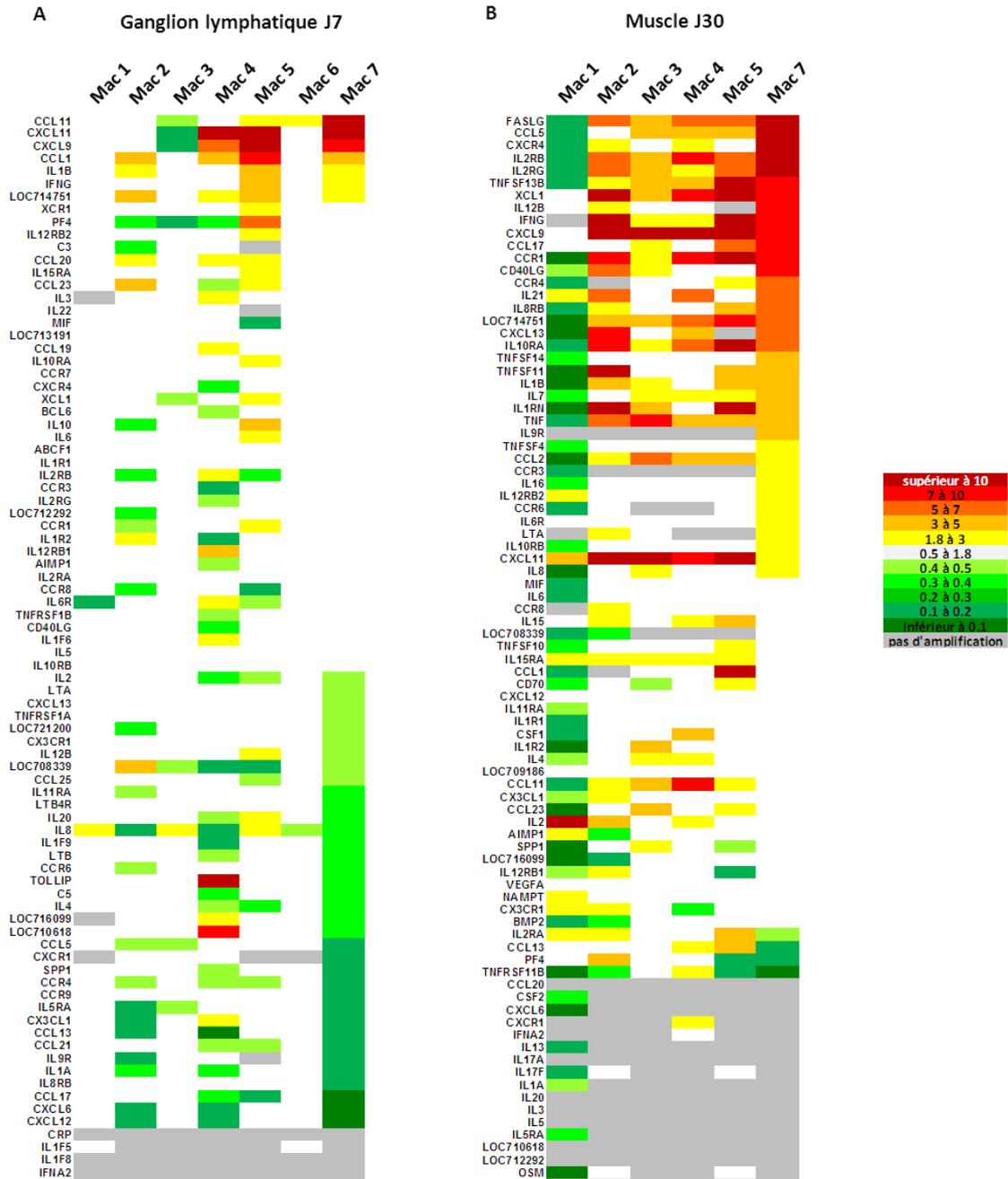
C'est pourquoi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression à l'échelle du transcrite de gènes codant pour des chimiokines et cytokines et leurs récepteurs *in situ*. Ces analyses ont dans un premier temps été réalisées sur les ganglions lymphatiques des primates à 7 jours post-injection (**Figure 36A**). Pour chaque gène, les résultats sont exprimés par un facteur correspondant à l'augmentation ou la diminution de l'expression du gène d'intérêt. Ce facteur correspond à la quantité relative de transcrits détecté dans le ganglion drainant divisée par la quantité relative de transcrits détecté dans le ganglion controlatéral utilisé comme contrôle interne. Les résultats montrent que dans les ganglions lymphatiques des primates injectés par voie LR avec le vecteur scAAV8-Des-GFP (Mac 1 et 3), les gènes impliqués dans la réponse inflammatoire ne semblent pas surexprimés excepté l'IL8 qui est une cytokine décrite comme une myokine. Dans ce groupe, seul Mac 2 semble surexprimer certains gènes mais ce primate présentait déjà un profil différent en matière de réponse cellulaire dirigée contre la protéine GFP. Par contre, chez les primates injectés par voie LR avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP des gènes codant pour des chimiokines telles que CXCL11, CXCL9 et CCL1 semblent surexprimés. Ces mêmes gènes sont d'ailleurs surexprimés chez le primate injecté par voie IM avec le même vecteur. Seul Mac 6 n'a pas présenté de surexpression de gène dans ce groupe mais il est à noter que le nombre de copies de génome viral dans le ganglion lymphatique drainant chez ce primate était 10 fois inférieur



**Figure 35 : Quantification de la concentration en cytokines circulantes.** La recherche de cytokines a été réalisée dans les plasmas des primates (Mac 1 à 7) collectés avant injection, à J1, J3, J7, J15 et J30 post-injection. La concentration en IL8 et en TNFα augmentent au cours du temps chez le primate injecté par voie IM, pas chez les primates injectés par voie LR. NA : non applicable, nd : non détecté.

au nombre observé chez les autres primates injectés par voie LR. Nos résultats suggèrent que les signaux induits dans le ganglion lymphatique après une administration par voie LR peuvent être dus, en plus du drainage du vecteur, à l'expression de la GFP dans ce tissu. En effet, du transcrit n'était pas détecté chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP contrairement à ceux injectés avec le scAAV8-CMV-GFP, que ce soit par voies IM ou LR. Par ailleurs, compte-tenu de cette différence entre les deux groupes injectés par voie LR, il semblerait que ces signaux délivrés dans le ganglion lymphatique drainant ne justifient pas totalement l'initiation de la réponse. En effet, ces signaux sont absents chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP alors qu'ils présentent eux aussi une réponse immune dirigée contre le produit du transgène sans perte de l'expression de la protéine GFP (au moins jusqu'à J90) comme dans le groupe injecté par voie LR avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP.

Cette même analyse est donc en train d'être réalisée sur les échantillons de muscle prélevés à J30 post-injection chez tous les primates injectés par voie LR ou IM avec les vecteurs scAAV8-Des-GFP (Mac 1-3) ou scAAV8-CMV-GFP (Mac 4, 5 et 7) (**Figure 36B**). Les résultats préliminaires montrent que des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire sont exprimés quelle que soit la voie d'administration (CCL5, CXCR9, CCL1 par exemple). Cependant, un plus grand nombre de gènes semble surexprimé chez le primate injecté par voie IM. L'analyse des gènes en question est actuellement en cours pour savoir si un groupe en particulier ressort. Par ailleurs, une analyse plus poussée de ces signaux inflammatoires semble nécessaire pour déterminer l'impact de l'inflammation *in situ* sur la perte de l'expression du transgène après transfert de gène par voie IM, contrairement à la voie LR.



**Figure 36 : Expression de gènes codant pour des chimiokines et cytokines et leurs récepteurs et impliqués dans la réponse inflammatoire.** Les primates ont été injectés avec un vecteur scAAV8-Des-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) ou avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 à 6) ou par voie IM (Mac 7). **A)** Analyse de ces gènes dans le ganglion lymphatiques à J7 post-injection. Le fold-change correspond à la quantité relative de transcrits détecté dans le ganglion drainant (côté injecté) divisée par la quantité relative de transcrits détecté dans le ganglion non-drainant (côté non-injecté) utilisé comme contrôle interne. **B)** Analyse de ces gènes dans les muscles à J30 post-injection. Le fold-change correspond à la quantité relative de transcrits détectée dans le membre injecté divisée par la quantité relative de transcrits détecté dans le membre controlatéral utilisé comme contrôle interne. Les valeurs de fold-change inférieures à 1 correspondent à une inhibition de l'expression du gène. Les valeurs de fold-change supérieures à 1,8 correspondent à une augmentation de l'expression du gène.

**En résumé :**

- **La voie LR permet une expression à long terme d'un transgène immunogène chez le primate contrairement à la voie IM.**
- **L'expression du transgène est maintenue malgré la présence d'une réponse immune humorale et cellulaire spécifique.**
- **Le drainage du vecteur et/ou des cellules transduites dans le ganglion lymphatique le plus proche est moins important après une administration par voie LR que par voie IM.**
- **Le nombre de gènes surexprimés et impliqués dans la réponse inflammatoire est plus faible dans le muscle injecté après une administration par voie LR que par voie IM.**
- **Des cellules T régulatrices sont infiltrées dans le muscle après injection du vecteur par voie LR.**



## ***C. Etude de la biodistribution du vecteur AAV dans les cellules de l'immunité après transfert de gène dans un modèle de primate***

### **1. Contexte de l'étude**

La transduction des PBMC par le vecteur AAV après transfert de gène *in vivo* reste assez peu étudiée. Jusqu'ici, il a été décrit que chez le primate, après une administration IM d'un vecteur AAV2, du génome viral peut être retrouvé dans ces cellules jusqu'à au moins 10 mois post-injection (Favre et al. 2001). Après une administration IM d'un AAV8, il est possible d'en détecter jusqu'à 15 à 20 semaines post-injection. Par contre après une injection par voie LR de ce même sérotype, la détection est variable : elle peut aller de 3 à 13 mois post-injection (Toromanoff et al. 2008). Enfin, chez l'Homme, du génome viral peut être détecté dans les PBMC jusqu'à 20 semaines post-injection dans le cadre d'une injection d'un vecteur AAV2 dans la veine porte (Manno et al. 2006). Ces études ne donnent cependant aucune information sur la quantité de génome viral détectée. Par ailleurs, nous n'avons aucune information sur les types cellulaires transduits.

Dans le but de documenter les interactions entre le vecteur AAV et les cellules de l'immunité, nous avons voulu étudier la biodistribution du vecteur AAV et l'expression du transgène dans ces cellules à différents temps post-injection. Cette étude a été réalisée à partir de prélèvements collectés sur les primates de l'étude précédente.

Dans cette étude, nous avons donc analysé la présence de génomes dans les cellules de l'immunité. L'expression de la GFP a également été étudiée dans ces cellules par cytométrie en flux. Enfin, et en collaboration avec le groupe de Richard Snyder en Floride, nous nous sommes intéressés aux formes moléculaires de l'AAV dans ces populations cellulaires.

Les résultats préliminaires obtenus pour cette partie sont présentés ci-après.

## **2. Matériel et méthode**

### **a) Animaux et vecteurs injectés**

Des animaux ont reçu soit un vecteur scAAV8-Des-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) soit un vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 à 6) ou par voie IM (Mac 7). Les procédures d'injection ainsi que la méthode de production des vecteurs sont décrites dans le matériel et méthode de la partie *Impact de la voie LR sur la biodistribution du vecteur et sur l'initiation d'une réponse immune*.

### **b) Isolement de PBMC à partir de sang total isolation**

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité. Le sang a été déposé sur du ficoll (d=1,093) puis centrifugé pendant 20 minutes à 1200g à température ambiante. L'anneau correspondant aux cellules mononucléées a alors été prélevé puis les cellules ont été lavées avec 50mL de PBS-5% SVF. Les globules rouges ont ensuite été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après la lyse, deux lavages ont été réalisés avec 50 mL de PBS-5% SVF. Les culots cellulaires ont été repris dans du SVF pour la congélation ou dans du milieu RPMI pour une analyse directe.

### **c) Isolement de cellules à partir de rate et de ganglion lymphatique**

Les splénocytes ont été isolés à partir des rates de primate prélevées à 60 jours post-injection. Les cellules de ganglion lymphatiques ont été isolées à partir des biopsies réalisées à J7 post-injection. Les cellules ont été obtenues après dissociations mécanique et enzymatique. Cette dernière consistait en un traitement à la collagénase D (2 mg/mL) suivi d'une incubation de 30 à 45 min à 37°C. De l'EDTA 0,1M pH7,2 est alors rajouté pour arrêter

la digestion enzymatique. Les suspensions cellulaires ont été récupérées après passage sur un tamis 70µm pour les ganglions et 100µm pour la rate et centrifugées 10 minutes à 580g à +4°C. Pour la rate, les globules rouges ont été lysés à l'aide d'un tampon de lyse (NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>EDTA) pendant 10 minutes à température ambiante. Après la lyse, deux lavages ont été réalisés avec 50 mL de PBS-5% SVF. Les culots cellulaires ont été repris dans du SVF pour la congélation ou dans du milieu RPMI pour une analyse directe.

#### **d) Tris cellulaires à partir de PBMC, splénocytes et cellules isolées à partir de ganglions lymphatiques**

Les différentes populations cellulaires ont été isolées à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules : le FACS Aria III (BD). Avant d'être marquées par les anticorps, les cellules ont été passées sur un tamis 0,3µm. Les populations LT CD4, LT CD8 et LB ont été isolées à l'aide des anticorps anti-CD3 et anti-CD4, anti-CD3 et anti-CD8 et anti-CD20 respectivement. Les populations de cellules dendritiques myéloïdes ou plasmacytoïdes ont été isolées à l'aide des marqueurs CD1c et CD123 respectivement. Pour les marquages, les cellules ont été incubées 30 minutes avec le mélange d'anticorps, à +4°C et à l'obscurité. Un lavage a ensuite été effectué par ajout de 10mL de tampon (PBS-0.5% FBS-EDTA 2mM) et le culot cellulaire a été repris à une concentration de 60 millions de cellules par mL dans ce même tampon. A la suite du tri cellulaire, les cellules ont été centrifugées cinq minutes à 1500g, à température ambiante et les culots cellulaires sont conservées à -80°C pour une analyse moléculaire.

#### **e) Phénotypage des PBMC et splénocytes**

Les DC plasmacytoïdes ont été marquées à l'aide d'un anti-CD123, les DC myéloïdes à l'aide d'un anti-CD1c dans la population n'exprimant pas le CD20. Les LB ont été marqués à l'aide d'un anti-CD20. Les populations de cellules NK, LT CD4, LT CD8 et Treg ont, quant à elles, été analysées à l'aide des marqueurs CD56, CD3/CD4, CD3/CD8 et CD3/CD4/CD25/CD127/Foxp3 respectivement. Enfin, l'analyse de la prolifération des LT, des monocytes et des LB a été réalisée à l'aide du marqueur intracellulaire Ki67. Tous les

marquages extracellulaires ont été incubés 20 minutes à +4°C à l'obscurité. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS 1X et reprises dans cette solution. Les marquages intracellulaires Foxp3 et Ki67 ont été réalisés à l'aide de solutions de perméabilisation et fixation du kit de marquage anti-Foxp3 humain (eBioscience). Les cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre LSR II (BD) de la plate-forme de cytométrie de la Structure Fédérative de Recherche (SFR) François Bonamy. Les analyses présentées ont été réalisées avec le logiciel FlowJo (BD, version 7.6.5).

#### **f) Détection de génome viral**

De manière à détecter du génome viral, l'ADN génomique des fractions enrichies a été extrait à l'aide du kit Genra Puregene (Qiagen). Les génomes viraux ont été quantifiés par qPCR à partir de 50 ng d'ADN génomique. Deux PCR ont été réalisées, l'une ciblant la séquence GFP, l'autre ciblant la séquence  $\epsilon$ -globine, gène endogène permettant de normaliser le nombre de copies. Les qPCR quantitative utilisant une sonde Taqman ont été réalisées grâce à l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). Les amorces et sondes utilisées ainsi que les programmes de PCR sont détaillées dans le matériel et méthode de la partie *Impact de la voie LR sur la biodistribution du vecteur et sur l'initiation d'une réponse immune*. Pour chaque échantillon, les résultats sont exprimés en vg/dg. Pour cela, les valeurs de Ct ont été rapportées à une gamme de dilution de plasmides portant les séquences GFP ou  $\epsilon$ -globine et allant de  $10^6$  à 10 copies.

#### **g) Analyse des formes moléculaires de l'AAV**

Dans le but de déterminer les formes moléculaires de l'AAV dans les différentes populations isolées, 250 ng d'ADN génomique, auxquels ont été ajoutés ou non  $3,5 \times 10^4$  copies de plasmide linéarisé pSSV9-MD2-cmEpo, ont été digérés avec 2,5 unités de PS-DNase (Plasmid-Safe ATP dependant DNase) pendant une heure à 37°C. La PS-DNase a été inactivée à l'aide d'une incubation de 30 minutes à 70°C. Le nombre de copies de plasmide linéarisé, de génome viral et d' $\epsilon$ -globine utilisé comme gène endogène a été quantifié à l'aide

de l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). Les qPCR utilisant des sondes Taqman ont été réalisées à l'aide de l'appareil ABI StepOne Plus (Applied Biosystems). Les amorces et la sonde utilisées pour amplifier la séquence de plasmide linéarisée cmEPO Exon 2-3 et la séquence endogène en conditions Taqman sont décrites dans la publication *Ni et al. 2011*. Les amorces et la sonde ciblant la GFP et utilisées pour amplifier le génome viral étaient : *amorce sens* 5'-GTCCGCCCTGAGCAAAGA-3'; *amorce antisens* 5'-TCCAGCAGGACCATGTGATC-3' et la sonde utilisée était: 5' (6 FAM)-3' TAMRA CCCAACGAGAAGCG.

## 2. Résultats

### a) Animaux et prélèvements

Les primates de l'étude ont été injectés soit avec un vecteur scAAV8-Des-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) soit avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 à 6) ou par voie IM (Mac 7). Tous les primates ont reçu une dose de  $7 \times 10^{12}$  vg/kg (**Tableau 4**). Dans le but d'étudier la présence de génome viral dans les cellules du système immunitaire, des prélèvements ont été effectués à différents temps post-injection. Les PBMC ont été isolés avant injection, à jour 15 (J15), J30, J45, J60, J75 et J90 puis tous les mois après l'injection. Les cellules isolées à partir de ganglions lymphatiques inguinaux et de rate ont été obtenues à J7 et J60 post-injection respectivement.

### b) Détection de génome viral dans les PBMC et cellules isolées à partir de rate et de ganglion lymphatique de primates

Dans le but de documenter la transduction des cellules immunitaires par l'AAVr chez le primate, nous nous sommes intéressés à la présence de génome viral dans les PBMC circulants, les splénocytes et les cellules de ganglion lymphatique. Pour cela, des qPCR ciblant la séquence codant pour la GFP ont été réalisées sur ces différentes populations. Les résultats sont exprimés en vg/dg. La quantification de génome diploïde a été faite grâce à

l'amplification du gène codant pour l' $\epsilon$ -globine. Il est établi qu'une cellule présente deux copies de ce gène.

	PBMC							Splénocytes	Ganglion drainant	Ganglion controlatéral
	J0	J15	J30	J45	J60	J75	J90	J60	J7	
<b>Mac 1</b>	nd	0,110	0,130	0,007	nd	0,005	nd	0,664	1,800	0,230
<b>Mac 2</b>	nd	0,019	0,035	nd	nd	nd	nd	3,11	2,460	0,187
<b>Mac 3</b>	nd	0,024	0,004	0,006	0,003	NA	nd	0,880	0,818	0,394
<b>Mac 4</b>	nd	0,015	0,010	0,004	nd	nd	nd	0,651	1,538	0,159
<b>Mac 5</b>	nd	0,050	0,020	0,020	0,011	nd	nd	0,737	6,100	0,248
<b>Mac 6</b>	nd	0,025	0,003	NA	NA	NA	NA	14,4*	1,580	0,029
<b>Mac 7</b>	nd	0,020	0,002	nd	nd	nd	nd	0,450	7,210	0,077

**Tableau 10 : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans les cellules immunitaires de primates.** Les primates ont été injectés avec un scAAV8-Desmin-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) ou avec un scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 à 6) ou par voie IM (Mac 7). Les PBMC ont été collectés avant injection puis à jour 15 (J15), J30, J45, J60, J75 et J90. Les splénocytes ont été isolés à J60 pour tous les primates sauf Mac 6 où ils ont été isolés à J30 (\*). Les ganglions lymphatiques inguinaux drainants et controlatéraux ont été isolés à J7 post-injection. La quantité de génome viral dans ces cellules a été déterminée par qPCR ciblant la GFP et est exprimé nombre de copies de GFP par génome diploïde. nd : non détecté, NA : non applicable.

Dans les PBMC, les cellules avant injection ne présentent pas de copie de GFP comme attendu. En revanche, du génome viral est détecté à J15 et J30 pour tous les primates quels que soient le promoteur ou la voie d'injection utilisés (**Tableau 10**). Le génome viral est détecté jusqu'à J45 pour Mac 4, J60 pour Mac 5 ou encore J75 pour Mac 1. Le nombre de copies pour chacun de ces animaux est cependant faible : il peut aller de 0,002 vg/dg à J30 pour Mac 7 à 0,13 vg/dg à J30 pour Mac 1. Concernant les cellules isolées à partir de rate et de ganglions lymphatiques inguinaux, du génome viral est également détecté dans ces cellules à J60 et J7 respectivement. Le nombre de copies déterminé dans les splénocytes isolés se situe entre 0,4 vg/dg pour Mac 7 et 3 vg/dg pour Mac 2. Mac 6 présente un nombre de copies plus important que les autres animaux mais la splénectomie n'a pas été réalisée au même moment post-injection : J30 pour Mac 6 contre J60 pour tous les autres animaux. Dans les cellules

isolées à partir des ganglions lymphatiques inguinaux, le nombre de copies de génome se situe entre 1,5 vg/dg pour Mac 6 et 7,2 vg/dg pour Mac 7. Les cellules du ganglion controlatéral présentent elles aussi du génome viral mais en plus faible quantité que dans les ganglions drainants : entre 0,029 vg/dg pour Mac 6 et 0,248 vg/dg pour Mac 5. Ces résultats montrent que l'AAV8r est bien capable de transduire les cellules immunitaires *in vivo*. Il reste à savoir si les cellules positives présentent du transcrit du transgène ou si elles expriment la protéine GFP.

### **c) Détection de génome viral dans les DC, LT et LB isolés à partir de PBMC et de rate**

Nous avons pu voir que l'AAV est capable de transduire certaines populations cellulaires telles que les PBMC et les splénocytes. De manière à caractériser plus en détails les populations transduites, nous avons réalisé des tris cellulaires à partir de ces différentes populations à l'aide d'un cytomètre trieur. Les LT CD4, LT CD8 et LB ont été triés à partir de PBMC isolés à J90. Les résultats montrent que du génome viral est présent dans les trois types cellulaires pour Mac 7, dans les LT CD4 pour Mac 4 et 5, dans les LB pour Mac 4 et enfin dans les LT CD8 pour Mac 3 (**Tableau 11**). Cette différence entre les primates peut s'expliquer par une limite de sensibilité de la technique. De plus, le fait de détecter du génome viral dans certaines populations triées et non dans les populations totales peut s'expliquer par une faible quantité de cellules transduites qui après enrichissement permet de détecter un nombre de copies supérieur au seuil de détection imposé par la technique.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans la partie consacrée à la souris, la transduction des DC par l'AAVr *in vivo* est assez controversée. Cependant, dans notre première étude, nous avons mis en évidence la transduction de ces cellules chez la souris *in vivo*. En effet, les DC présentaient à la fois du génome viral et du transcrit et exprimaient la GFP mais la fréquence des cellules transduites semblait néanmoins faible puisque des cellules transduites n'étaient pas détectées chez toutes les souris par immunohistochimie. Nous avons donc voulu confirmer ces résultats dans notre modèle de primate. Ces cellules ne représentent malheureusement qu'environ 1% des PBMC circulants. Compte-tenu du volume de sang pouvant être prélevé chez nos animaux, le nombre de cellules obtenu après tri cellulaire

n'aurait pas été suffisant pour réaliser nos analyses. Les pDC et cellules dendritiques myéloïdes (mDC) ont donc été isolées à partir des splénocytes. Comme précédemment, la présence de génome viral a été mise en évidence par qPCR. Les résultats montrent que les populations sont bien transduites par l'AAV8r. En effet, les mDC et pDC présentent du génome viral après une injection par voie LR ou IM (**Tableau 12**). La quantité de génomes viraux détectée dans ces fractions est comparable quels que soient le promoteur ou la voie d'injection utilisés.

	PBMC (J90)		
	LT CD4	LT CD8	LB
<b>Mac 1</b>	nd	nd	nd
<b>Mac 2</b>	NA	NA	NA
<b>Mac 3</b>	nd	nd	0,004
<b>Mac 4</b>	0,004	0,003	nd
<b>Mac 5</b>	0,007	nd	nd
<b>Mac 6</b>	NA	NA	NA
<b>Mac 7</b>	0,013	0,039	0,004

**Tableau 11 : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans les LT CD4 et LT CD8 et les LB isolés à partir de PBMC.** Les primates ont été injectés avec un scAAV8-Desmin-GFP par voie LR (Mac 1 à 3) ou avec un scAAV8-CMV-GFP par voie LR (Mac 4 à 6) ou par voie IM (Mac 7). Les PBMC ont été collectés et triés à J90 post-injection. La quantité de génome viral a été déterminée dans ces cellules par qPCR ciblant la GFP et est exprimé nombre de copies de GFP par génome diploïde. nd : non détecté, NA : non applicable.

Dans notre modèle, il apparaît donc que les cellules immunitaires sont transduites par l'AAV8r, au moins à l'échelle du génome viral. Nous avons alors voulu déterminer si le génome viral présent dans ces cellules s'exprimait.

	Rate	
	pDC	mDC
<b>Mac 1</b>	0,053	0,023
<b>Mac 2</b>	0,055	0,048
<b>Mac 3</b>	0,041	0,053
<b>Mac 4</b>	0,007	0,554
<b>Mac 5</b>	0,923	0,329
<b>Mac 6</b>	0,030*	0,023*
<b>Mac 7</b>	0,030	0,096

**Tableau 12 : Nombre de copies de génome viral par génome diploïde détecté dans cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes isolées à partir de splénocytes.** Les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes ont été isolées et triées à J60 post-injection sauf pour Mac 6 où elles ont été isolées à J30 post-injection (\*). La quantité de génome viral a été déterminée dans ces cellules par qPCR ciblant la GFP et est exprimée nombre de copies de GFP par génome diploïde.

#### **d) Expression de la protéine GFP dans les PBMC et fractions cellulaires isolées à partir de rate**

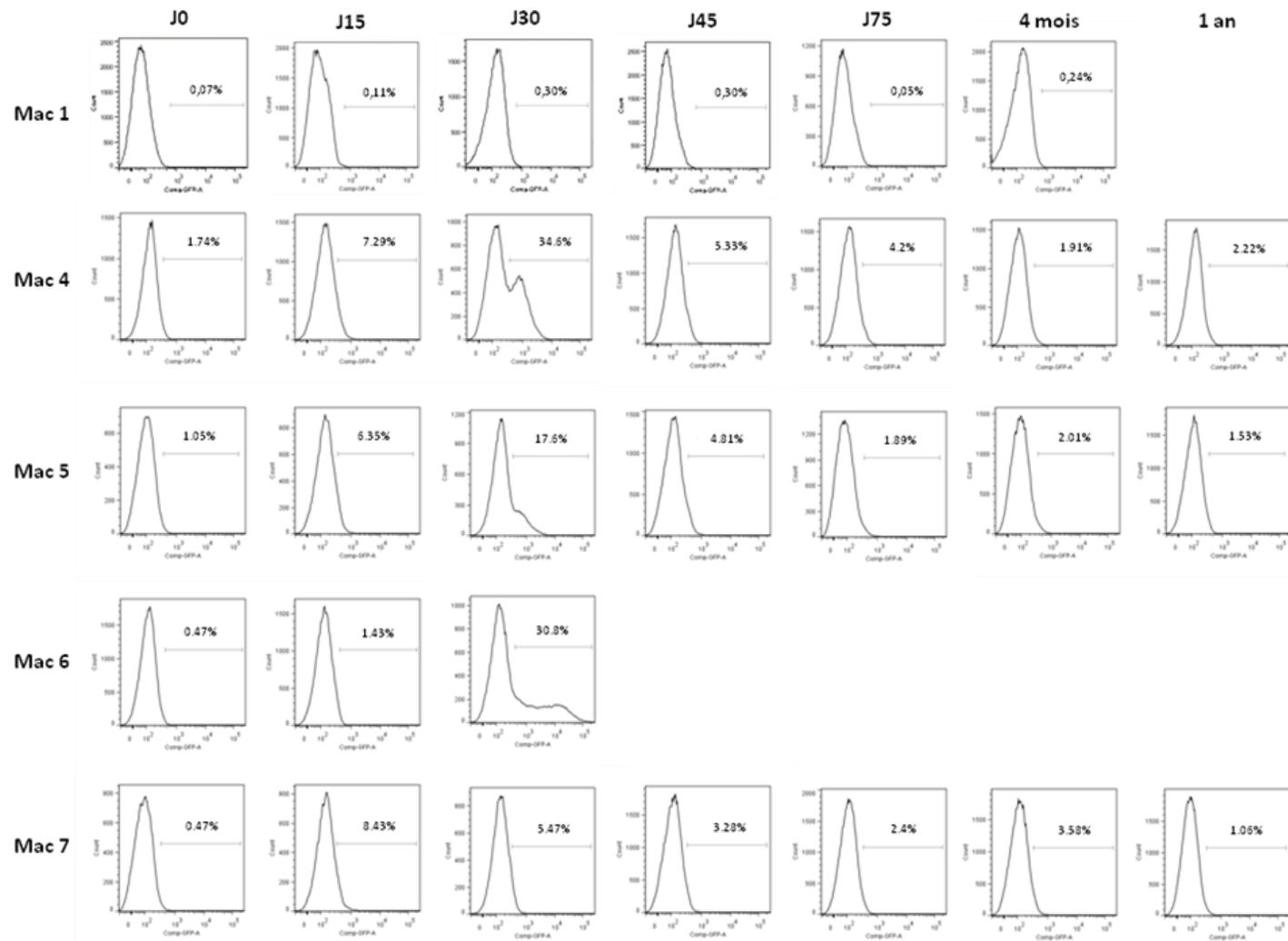
L'expression de la GFP a été étudiée dans ces cellules par cytométrie en flux. Les PBMC ont été analysés à différents temps post-injection : J15, J30, J45, J75, 4 mois et 1 an chez les primates ayant reçu le vecteur scAAV8-CMV-GFP par voie LR ou IM. Les splénocytes de ces mêmes primates ont été étudiés à J60 post-injection. L'analyse de la population totale de PBMC montre que du signal GFP est détectable dans ces cellules à J15 et à J30 post-injection (**Figure 37**). Alors que le primate injecté par voie IM présente un maximum de 6% de cellules positives pour la GFP à J15 (Mac 7), les primates injectés par voie LR présentent un maximum de 17,6 (Mac 5) à 34,6% (Mac 6) à J30 post-injection. Un pourcentage de cellules positives pour la GFP est encore détectable chez ces primates injectés par voie LR à J45 sans dépasser les 5,3 % (Mac 5), ce n'est plus le cas à J60. Les primates injectés par voie LR avec le vecteur scAAV8-Des-GFP ne présentait quant à eux pas de signal GFP dans leur PBMC quel que soit le temps post-injection.

Les splénocytes présentent également du signal GFP chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP : 9% des cellules sont positives pour le primate injecté en IM (Mac 7) et entre 5 (Mac 6) et 16% (Mac 5) pour les primates injectés par voie LR (**Figure 38**). Les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP présentent eux aussi du signal GFP dans leurs splénocytes mais en plus faible quantité : entre 3 % (Mac 1) et 6% (Mac 3).

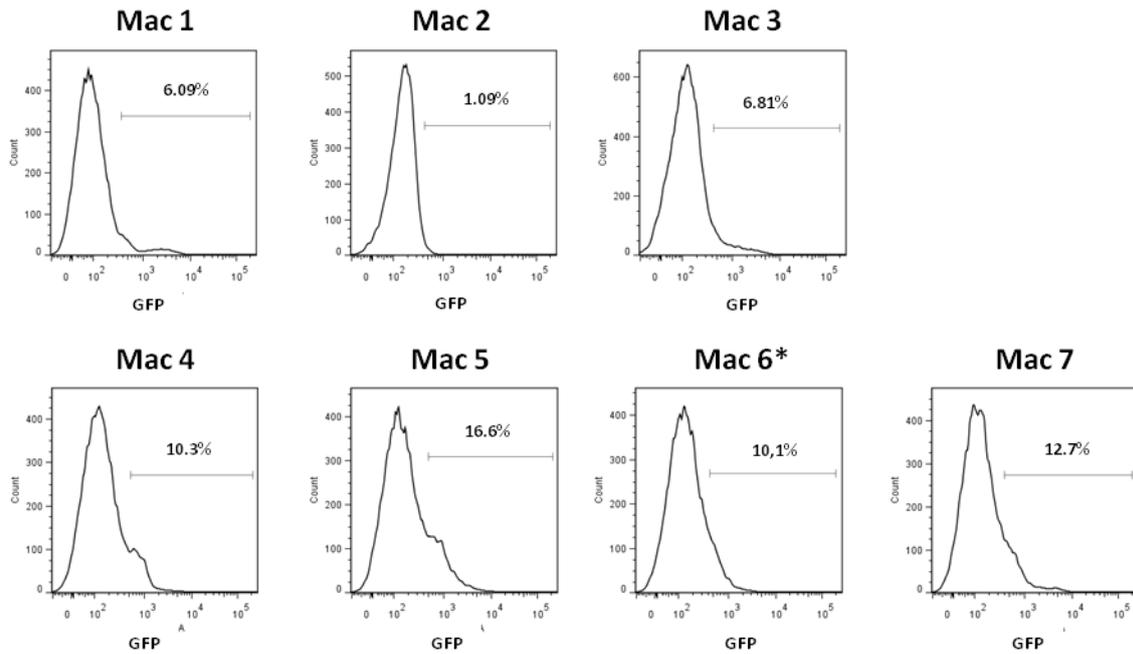
Une analyse plus poussée des populations cellulaires présentes dans les PBMC a montré quelles cellules présentaient du signal GFP. Les populations étudiées étaient les suivantes : les pDC, les mDC, les LB, les cellules NK et les LT (**Tableau 13**). Les analyses de ces populations montrent que 36 à 44% des LB présentent du signal GFP à J30 pour Mac 4 et 5 respectivement contre 2% pour Mac 7. Concernant les DC, 72 à 66% des mDC sont positives pour la GFP à J30 pour Mac 4 et 5 respectivement contre 1,7% pour Mac 7 et 19 à 42% contre 1,7% des pDC présentent du signal GFP chez ces mêmes primates, toujours à J30 post-injection. Il est cependant à noter que ces pourcentages ne représentent qu'un très faible nombre de cellules : les mDC représentent de 0,2 à 6 % des cellules dans les PBMC circulants et les pDC de 0,2 à 1,6%. Il faut donc considérer ces résultats avec prudence. Les monocytes et les cellules NK présentent du signal GFP à plus de 80 % chez Mac 4 et 5 contre 0,5% dans les monocytes et 3,5% dans les NK pour Mac 7. Enfin, les LT sont les seules cellules circulantes qui sont faiblement positives pour la GFP. En effet, seulement 0,1 à 3% de cellules présentent du signal GFP. Il est possible que cette absence d'expression de la protéine GFP soit due à une inhibition du promoteur CMV dans ces cellules (Salmon et al. 2000).

#### e) **Devenir des PBMC transduits dans la circulation**

Les analyses réalisées sur les PBMC ont montré un pic d'expression de la GFP dans ces cellules à J30 post-injection. Ce signal est encore présent à J45 bien que plus faible et disparaît à J60 chez les primates injectés par voie LR. Ces résultats sont en accord avec ce qui est observé en PCR quantitative pour la recherche de génome viral. Le fait de ne plus détecter de génome viral ou de signal GFP peut s'expliquer soit par la division de ces cellules qui aboutirait à une dilution des génomes viraux et/ou du signal GFP qui ne serait plus détectable par nos techniques d'analyse soit par le recrutement de ces cellules dans les organes lymphoïdes. Pour confirmer ces hypothèses, nous avons d'une part analysé la prolifération de



**Figure 37 : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP, en fonction du temps, dans les PBMC circulants.** Les PBMC ont été collectés avant injection puis à J15, J30, J45, J75, 4 mois et un an post-injection. Le pourcentage de cellules présentant du signal GFP a été mesuré par cytométrie en flux sur la population de PBMC.



**Figure 38 : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP dans les splénocytes à J60 post-injection.** Les splénocytes ont été collectés J60 post-injection sauf pour Mac 6 où ils ont été collectés à J30 (\*). Le pourcentage de cellules présentant du signal GFP a été mesuré par cytométrie en flux dans cette population.

	LB	pDC	mDC	Monocytes	NK	LT
<b>Mac 4</b>	36,8	19,2	72,7	82,2	85,9	2,8
<b>Mac 5</b>	44,3	42,2	66,6	83,3	89,1	3,3
<b>Mac 6</b>	42,0	90,9	97,9	99,0	98,3	7,3
<b>Mac 7</b>	2,3	1,7	1,7	0,5	3,5	3,0

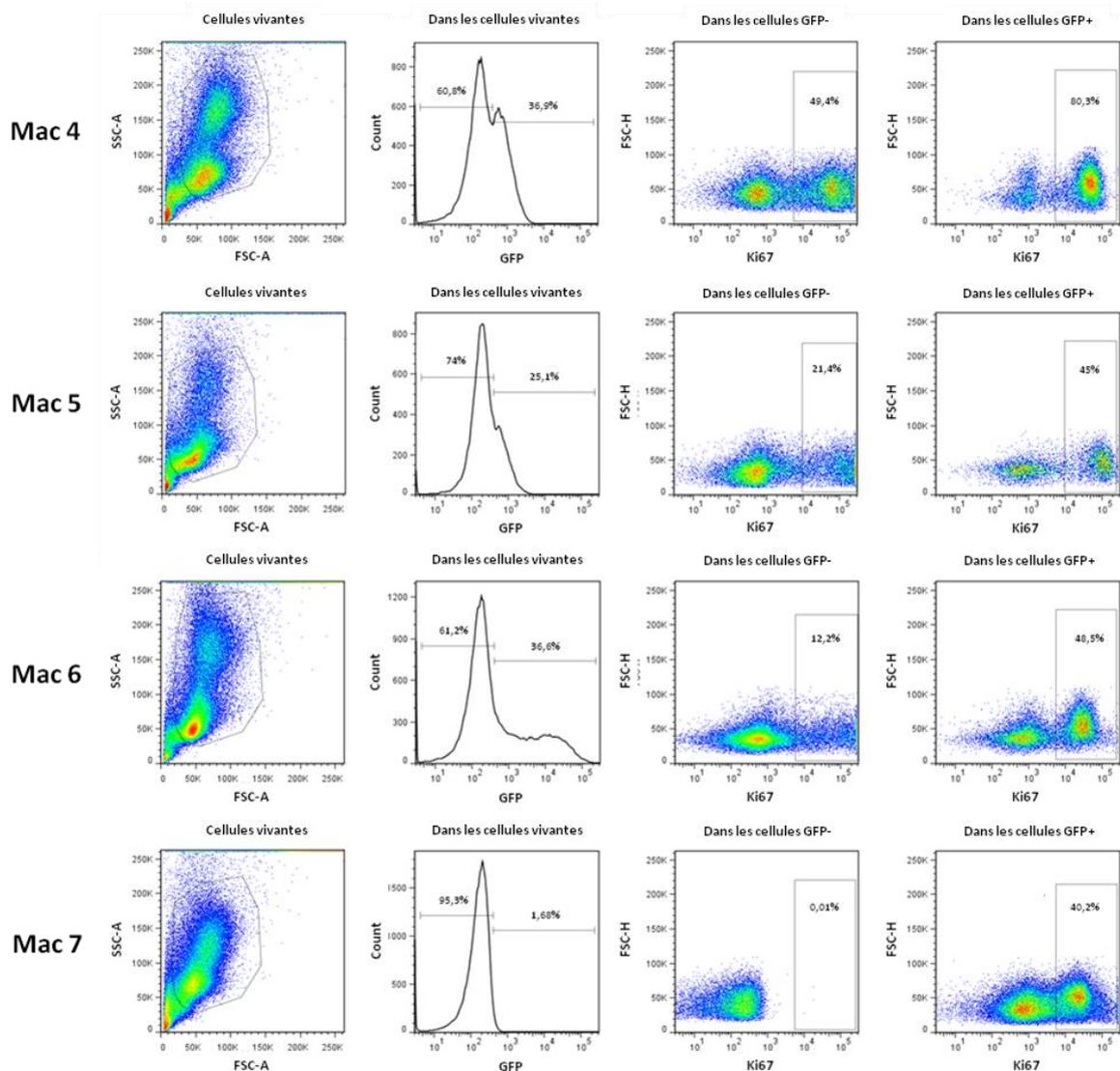
**Tableau 13 : Pourcentage de cellules présentant du signal GFP dans les différentes populations cellulaires des PBMC circulants à J30 post-injection.** Le pourcentage de LB, pDC, mDC, monocytes, NK et LT présentant du signal GFP a été analysée par cytométrie en flux dans les PBMC circulants prélevés à J30 post-injection. Cette analyse a été réalisée uniquement pour les primates présentant du signal GFP à J30 post-injection.

ces cellules à 30 jours post-injection et d'autre part étudié les formes moléculaires des génomes dans les PBMC au cours du temps.

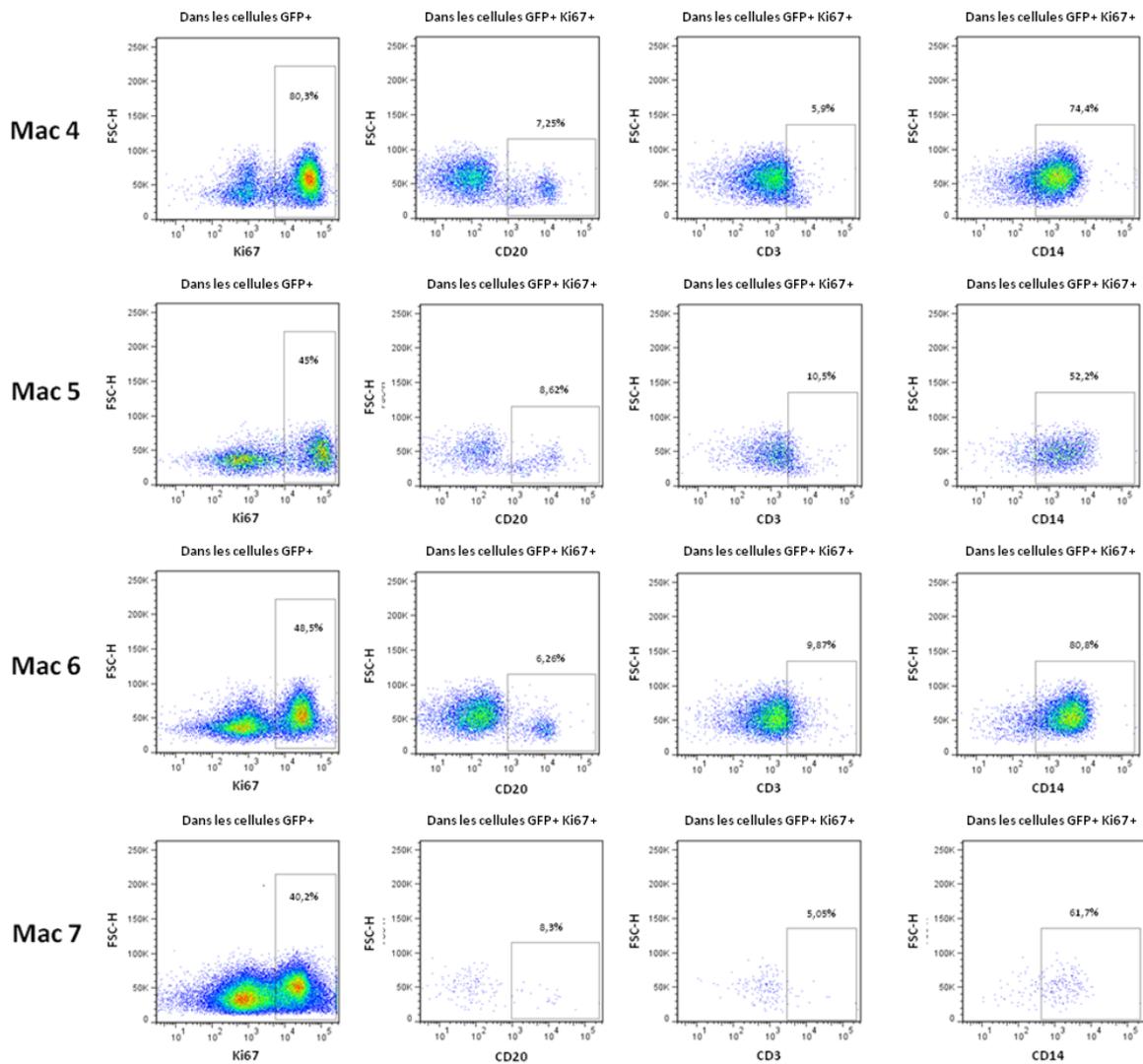
Tout d'abord, nous avons voulu vérifier si la perte de signal GFP dans les PBMC à J45 post-injection était due à une prolifération de ces cellules. Pour cela, nous avons utilisé un marqueur intracellulaire de prolifération : le Ki67. L'analyse de ce marqueur a été réalisée uniquement sur les PBMC prélevés à J30, temps post-injection où le pourcentage en cellules GFP positives est le plus élevé. Les résultats montrent que les cellules qui expriment la GFP sont pour un grand nombre en phase de prolifération : de 47% pour Mac 6 à 78% pour Mac 4 (**Figure 39**). Les cellules qui ne présentent pas de signal GFP représentent quant à elles entre 12 et 49% de la population pour Mac 6 et Mac 4 respectivement. Cela pourrait donc expliquer la diminution du signal pour les temps post-injection ultérieurs. Par ailleurs, les cellules présentant du signal GFP et exprimant le Ki67 ont été analysées de manière plus approfondie. Cette analyse révèle que ce sont majoritairement les monocytes (CD14) qui présentent du signal GFP : entre 52 % pour Mac 5 et 82 % pour Mac 6. Les lymphocytes B (CD20) et les lymphocytes T (CD3) ne représentent respectivement que 4 (Mac 6) à 8% (Mac 5) et 4 à 10% de cette population (**Figure 40**).

Dans le but de confirmer si la prolifération des cellules entraînait une diminution du nombre de copie de vecteur dans la circulation, nous nous sommes intéressés aux formes moléculaires du génome de l'AAV dans cette population au cours du temps. Cette partie de l'étude a été réalisée en Floride, en collaboration avec le groupe de Richard Snyder et permettait de confirmer ou pas la quantification des génomes viraux par qPCR classique (**Tableau 10**). Cette analyse a été réalisée sur les PBMC totaux à différents temps post-injection mais également sur les splénocytes totaux et les fractions enrichies en LT CD4, LT CD8 et sur les monocytes (CD16) isolées à partir de splénocytes. Ces échantillons proviennent des Mac 4 et Mac 5, tous deux injectés par voie LR avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP.

Il est décrit que le génome de l'AAV recombinant persiste en tant qu'épisome, sous forme de monomères ou de concatémères, dans les tissus tels que le muscle, le foie ou encore le cerveau dans des modèles de souris ou de primates (Clark et al. 1999; Nakai et al. 2001 ; Duan et al. 1998 ; Nathwani et al. 2006 ; Penaud-Budloo et al. 2008). Afin d'étudier sous quelle forme est présent le génome de l'AAV, 250ng d'ADN génomique extrait à partir de PBMC et de splénocytes totaux ou triés ont été incubés avec 2,5 unités de PS-DNase (Plasmid-Safe ATP dependant DNase), enzyme décrite pour digérer spécifiquement les ADN



**Figure 39 : Analyse de la prolifération des PBMC de primates à J30 post-injection dans les populations présentant et ne présentant pas de signal GFP.** La prolifération des cellules a été déterminée à l'aide du marqueur de prolifération Ki67. Le pourcentage de cellules présentant du signal GFP a été déterminé dans la population de cellules vivantes puis le pourcentage de cellules en prolifération a été analysé dans ces cellules vivantes présentant ou non du signal GFP. Ces analyses ont été effectuées uniquement chez les primates dont les PBMC présentaient du signal GFP à 30 jours post-injection.

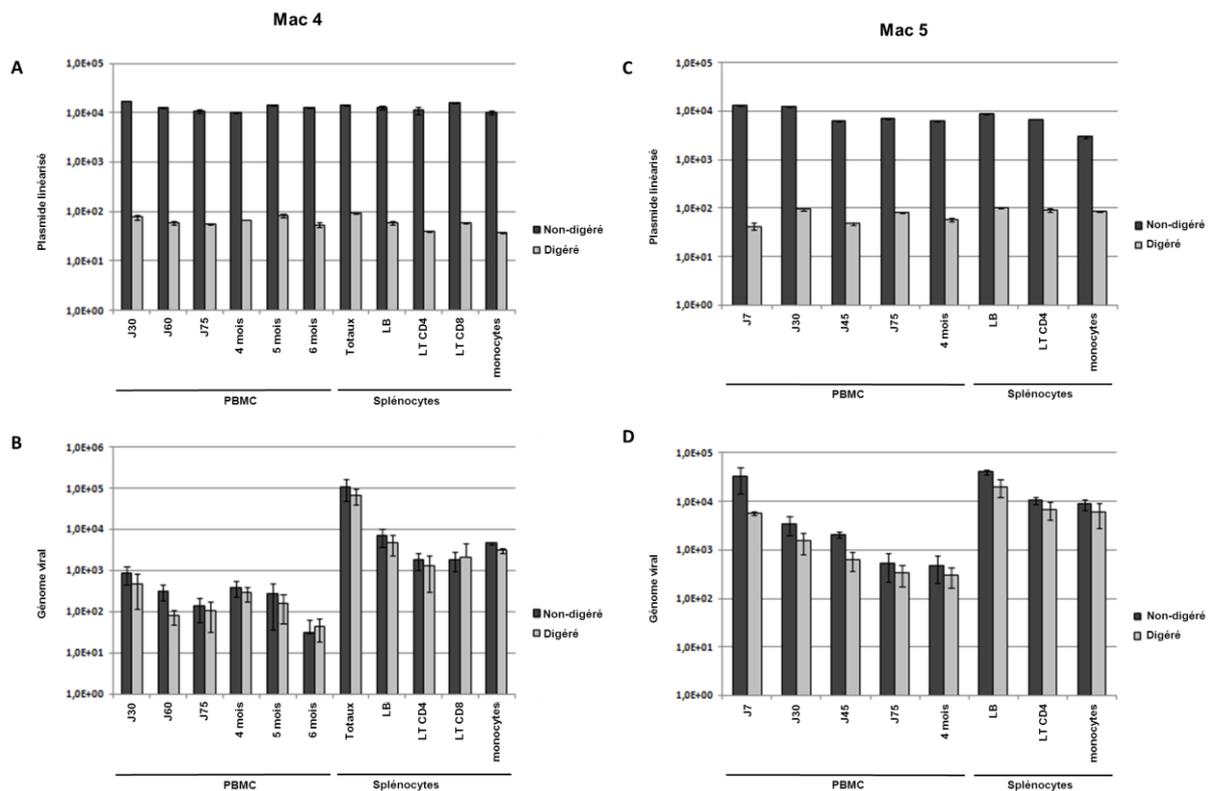


**Figure 40 : Caractérisation des cellules en prolifération présentant du signal GFP.** Les cellules présentant du signal GFP et en prolifération ont été caractérisées par cytométrie en flux. Les populations LB (CD20), LT (CD3) et les monocytes (CD14) ont été analysées.

double brin présents sous forme linéaire. Dans le but d'évaluer l'efficacité de cette enzyme, elle a été mise en présence de 250ng d'ADNg extrait à partir de PBMC ou de splénocytes totaux ou triés auxquels  $3,5 \times 10^4$  copies de plasmide linéarisé ont été ajoutés. Les résultats montrent que la PS-DNase est capable de digérer au moins 2 logs soit 99% de la séquence plasmidique en présence d'ADNg (**Figure 41 A, C**). Concernant le génome de l'AAV recombinant, il est présent sous forme épisomale dans toutes les populations cellulaires étudiées : PBMC et splénocytes totaux ou triés. En effet, l'ajout de la PS-DNase n'entraîne pas de dégradation de l'ADN provenant de l'AAVr. Par ailleurs, les formes circulaires sont détectables dès J7 post-injection dans les PBMC et persistent jusqu'à au moins 6 mois. Ces

épisomes sont également quantifiables à J60 post-injection dans les splénocytes et fractions enrichies à partir de ces cellules : les LT CD4, LT CD8 et monocytes (CD16) (**Figure 41 B, D**). Un contrôle interne a également été réalisé en ciblant la séquence endogène codant pour l' $\epsilon$ -globine. En présence de la PS-DNase, 99,5% de l'ADNg de macaque est éliminé (résultats non-présentés).

Ces résultats montrent donc que le génome viral est détectable dans les PBMC jusqu'à au moins 6 mois post-injection sous forme d'épisomes circulaires majoritairement. Par ailleurs, cette méthode d'analyse paraît plus sensible que notre analyse classique par PCR quantitative. En effet, avec cette dernière, nous ne pouvions mettre en évidence la présence de génome viral au-delà de 75 jours après l'injection.



**Figure 41 : Analyse des formes moléculaires du génome de l'AAV dans les PBMC et les splénocytes de primates.** L'ADNg a été extrait à partir de PBMC et de splénocytes de primates injectés par voie LR avec un scAAV8-CMV-GFP (Mac 4 et 5).  $3,5 \times 10^4$  copies de plasmide linéarisé ont été ajoutés (A,C) ou non (B, D) à 250 ng d'ADNg et digérés à la PS-DNase. Le nombre de copies de plasmide linéarisé et de génome viral a été déterminé par qPCR ciblant une séquence du plasmide ou du génome viral.

**En résumé :**

- **Le vecteur AAV de sérotype 8 est capable de transduire les cellules du système immunitaire dans un modèle de primate *in vivo*.**
- **Son génome se présente principalement sous forme d'épisomes circulaires dans ces cellules.**
- **Le vecteur AAV de sérotype 8 est capable de transduire les DC *in vivo* chez le primate après une administration par voie LR ou IM confirmant ainsi les résultats obtenus chez la souris.**



## IV. Discussion

A l'heure actuelle, de nombreuses études montrent qu'en l'absence d'une réponse immunitaire, le transfert de gène à l'aide d'AAVr permet une expression à long terme du transgène (Flotte et al. 2011 ; Nathwani et al. 2011 ; Bennett et al. 2012). Parmi les voies d'administration possibles, la voie IM est rapidement apparue comme une voie de choix pour le transfert de gène car elle est facilement accessible et présente des applications pour le traitement de maladies musculaires mais également de maladies métaboliques. Cependant, lors de la translation de protocoles de thérapie génique chez le rongeur vers des modèles de gros animaux, cette voie s'est révélée immunogène notamment vis-à-vis du transgène (R W Herzog et al. 2001; Favre et al. 2002; Ross et al. 2006; Mendell et al. 2010a; Flotte et al. 2011). A l'inverse, la voie LR a montré une meilleure efficacité de transduction des muscles du membre injecté mais s'est surtout révélée moins immunogène dans des modèles de gros animaux (Toromanoff et al. 2010 ; Haurigot et al. 2010). Les mécanismes à l'origine du maintien de l'expression du transgène ou de son rejet restent encore mal élucidés. Il apparaît cependant que la nature des interactions entre le vecteur AAV et le système immunitaire pourrait être déterminante dans le déclenchement d'une réponse. En effet, contrairement à la voie LR, la voie IM entraîne une concentration de vecteur au site d'injection pouvant favoriser la transduction de cellules immunitaires par l'AAVr *in situ* (Arruda et al. 2005 ; Toromanoff et al. 2010). Basée sur ces observations, cette thèse a eu pour objectif principal de comprendre en quoi la voie LR est moins immunogène que la voie IM en étudiant les interactions entre le vecteur AAV et les acteurs du système immunitaire après transfert de gène dans le muscle squelettique.

Nous nous sommes, tout d'abord, focalisés sur ces interactions dans un modèle murin après une administration par voie IM d'un vecteur scAAV8 codant pour la protéine GFP. La biodistribution du vecteur après une administration par voie IM dans le tibial antérieur des souris a été analysée à l'échelle du génome viral et du transcrit. Les résultats ont montré la présence de génome viral et de transcrit entre 7 et 30 jours post-injection dans les ganglions lymphatiques inguinaux drainants et la rate. Ces résultats suggèrent donc que le vecteur viral et/ou des cellules transduites sont rapidement acheminés dans les organes lymphoïdes. Jusqu'ici, les études de biodistribution n'avaient analysé la présence de génome viral dans les

organes lymphoïdes secondaires qu'à des temps plus tardifs post-administration du vecteur : l'AAV8r était détectable dans les organes lymphoïdes à un mois chez la souris (Wang et al. 2005) ou à plus d'un an post-injection chez le primate (Toromanoff et al. 2008). Or, dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence que l'acheminement du vecteur est beaucoup plus précoce et même plus précoce que J7. En effet, dans une étude cinétique préliminaire que nous avons réalisée et consistant à injecter par voie IM des souris avec un vecteur scAAV8 codant pour la GFP à une dose de  $6 \times 10^{10}$  vg (soit environ  $3 \times 10^{12}$  vg/kg), nous avons observé du génome viral dès 24 heures après administration dans les organes lymphoïdes. Il est à noter que l'analyse des transcrits n'a pas été exploitée dans cette étude car le promoteur utilisé ici (promoteur PGK) s'est avéré trop faible tout comme la dose de vecteur injecté. Il est cependant possible que cette biodistribution précoce du vecteur soit spécifique de l'AAV8r qui est décrit comme pouvant traverser les barrières endothéliales (Wang et al. 2005). Cette propriété lui permet ainsi une biodistribution diffuse *in vivo* après une administration locale (Toromanoff et al. 2008). En effet, dans une autre étude utilisant des vecteurs avec des capsides bioluminescentes chez la souris, l'AAV8r est retrouvé dans le foie dès cinq minutes après son administration par voie IM (A Asokan et al. 2008)

Alors que du génome viral et du transcrit étaient détectés dans les organes lymphoïdes secondaires, l'étude de la présence de la protéine GFP par fluorescence directe a confirmé que les transcrits étaient traduits en protéine. En effet, ces tissus montrent la présence de protéine GFP dans les zones folliculaires. A ce jour, la transduction de cellules par l'AAVr dans la rate a déjà été décrite dans des modèles de primate (Wang et al. 2011) et de chien (Haurigot et al. 2010), mais aucun de ces groupes n'a pu mettre en évidence les types cellulaires transduits. Et ce, probablement parce que le nombre des cellules transduites reste assez faible. D'autres études ont conclu à une transduction des DC après administration d'AAVr *in vivo* mais de façon indirecte, en utilisant des vecteurs régulés avec des séquences cibles de miRNA 142. En effet, dans ces études, l'utilisation de séquences miR142-3p permet de prévenir la réponse immune dirigée contre le transgène (Boisgerault et al. 2013 ; Majowicz et al. 2013). Dans notre étude, nous avons pu montrer que ce signal GFP colocalise avec les cellules LB, les LT et même les DC mais en très faible nombre

Afin de confirmer que le signal GFP détecté était bien dû à une transduction des cellules et non pas à une capture de la protéine GFP par endocytose, nous avons recherché les génomes viraux et les transcrits du transgène dans des fractions cellulaires enrichies en DC à

partir de splénocytes totaux. Les génomes viraux étaient détectés au même titre que les transcrits dans les DC, mais également dans les LT. Bien que les résultats obtenus proviennent de fractions enrichies en DC à partir de splénocytes provenant d'un pool des rates prélevées (n=6), ils ont été reproduits chez les différents groupes de souris euthanasiées à J7, J15 et J30 post-injection. Le point J15 a même été réalisé deux fois avec deux productions de vecteurs différentes. Concernant les transcrits, la technique de RT-PCR quantitative seule n'a pas été suffisamment sensible pour leur détection. Il a donc fallu réaliser un Southern Blot après une RT-PCR, ce qui confirme de nouveau que la transduction des DC est assez faible. Il peut s'agir soit d'évènements rares exprimant fortement le génome viral soit, au contraire, d'un grand nombre de cellules l'exprimant faiblement. Il semblerait cependant que l'injection par voie IM n'entraîne pas une transduction massive des DC compte-tenu de la rareté des évènements observés dans notre étude et l'absence de données dans la littérature concernant ce sujet. Rappelons tout de même qu'un faible nombre de cellules dendritiques est capable d'induire une réponse immunitaire (Banchereau et Steinman 1998). Nos résultats confirment tout de même les études réalisées *in vitro* montrant la capacité des AAVr à transduire les DC dérivées de monocytes (Aldrich et al. 2006 ; Veron et al. 2007 ; Veron et al. 2009).

Il semblerait donc que l'initiation d'une réponse immune envers le produit du transgène après une injection par voie IM d'un AAVr de sérotype 8 puisse être induite par la transduction de DC et une présentation directe des antigènes. Il reste néanmoins à savoir si la transduction des DC est associée aux signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T et la génération d'une réponse effectrice. Une étude récente suggère que non (Mays et al. 2013). En effet, dans cette étude, l'utilisation de l'AAVr de sérotype 8 semble induire une tolérance vis-à-vis du transgène contrairement à un vecteur AAV2/rh32.33. Dans cette étude, les DC ont été récupérées à partir de ganglions lymphatiques poplités et inguinaux et de rates après une injection par voie IM. Ces cellules ne semblent pas surexprimer les marqueurs d'activation tels que le CMH II, CD80/86 ou CD40 contrairement au sérotype AAV2/rh32.33. En accord avec l'étude de L Vandenberghe (Vandenberghe et al. 2006), ces résultats suggèrent que les interactions entre les DC et l'AAVr varient en fonction du sérotype utilisé et que cela a un impact direct sur l'initiation d'une réponse immune.

Enfin, nous avons montré que les vecteurs ssAAV8 sont également capables de transduire les DC *in vivo*. En effet, bien que l'analyse par immunohistochimie n'ait pas permis de montrer une transduction directe des DC, nous avons montré une transduction de

ces cellules à l'échelle moléculaire à travers la détection de génomes viraux et de transcrits. Ces résultats sont en désaccord avec de précédentes études décrivant une inefficacité des vecteurs ssAAV à transduire efficacement les DC à cause de l'étape dite « limitante » de conversion de l'ADN simple brin en double brin dans ces cellules (Veron et al. 2009 ; Aldrich et al. 2006).

En dehors de la présentation des antigènes issus du transgène par les DC transduites, on ne peut pas exclure pour autant le déclenchement d'une réponse immunitaire par la voie de la *cross*-présentation jusque-là admise. Les dernières données concernant ce sujet vont d'ailleurs dans ce sens puisque récemment des études ont montré que l'insertion de séquences cibles du mir142-3p, spécifique des cellules hématopoïétiques (Brown et al. 2007), dans un vecteur AAV de sérotype 1 permet de prévenir le rejet du produit du transgène après une injection par voie IM chez de souris saines (Majowicz et al. 2013 ; Boisgerault et al. 2013). En revanche, la même stratégie ne semble pas efficace dans un tissu inflammatoire comme décrit dans les myopathies (Boisgerault et al. 2013). En effet, la séquence cible du mir142-3p n'empêche pas le rejet du produit du transgène chez des souris déficientes en  $\alpha$ -sarcoglycane mais le retarde seulement. Cette observation renforce l'hypothèse que la *cross*-présentation est également à l'origine de l'initiation de la réponse immune, au moins dans un contexte musculaire inflammatoire.

Nos résultats, couplés à la littérature, nous orientent donc vers deux phénomènes capables de déclencher une réponse immune contre le produit du transgène suite à une administration du vecteur par voie IM : la transduction directe d'APC professionnelles et/ou la *cross*-présentation.

La deuxième problématique de cette thèse était de confirmer le caractère moins immunogène de la voie LR comparée à la voie IM et de comprendre quels étaient les mécanismes permettant le maintien de l'expression du transgène à long terme. Pour cela, nous avons choisi de travailler dans un modèle cliniquement pertinent : le primate. De plus, nous nous sommes placés dans un contexte considéré comme immunogène. En effet, nous avons choisi d'injecter un vecteur scAAV décrit comme plus immunogène que les vecteurs ssAAV (Martino et al. 2011 ; T. Wu et al. 2011) codant pour la protéine GFP décrite elle aussi comme fortement immunogène chez le primate (Wang et al. 2010). Enfin, comme l'initiation d'une réponse immune peut être dépendante de la dose du vecteur, nous avons injecté une forte dose

d'AAVr au regard des essais cliniques (Flotte et al. 2011 ; Nathwani et al. 2011 ; Gaudet et al. 2013).

Ainsi, en accord avec les études précédentes (Toromanoff et al. 2010 ; Arruda et al. 2010), l'étude de la biodistribution du vecteur ainsi que l'expression de la protéine GFP dans les muscles a montré qu'une injection par voie LR permettait une expression à long terme du transgène, contrairement à la voie IM. La protéine GFP a été détectée aussi bien dans le membre injecté que dans les muscles à distance que ce soit avec un promoteur CMV (jusqu'à au moins un an) ou un promoteur desmine (jusqu'à au moins J90 dans ce groupe). Ces observations sont assez surprenantes du fait de la forte immunogénicité de la GFP chez le macaque puisqu'elle est généralement rejetée entre un et trois mois après administration du vecteur (Wang L et al. 2010 ; Moreau et al. 2009 et données non-publiées). Par ailleurs, nos résultats étaient en accord avec la détection de génomes viraux et de transcrits. Cette analyse de la biodistribution du vecteur a cependant montré, chez tous les primates, quelques disparités en matière de profil d'expression et de nombre de copies au cours de l'étude cinétique réalisée à l'aide de biopsies chirurgicales de muscle. La petite taille des biopsies pourrait induire un biais et être responsable au moins en partie de ces disparités de transduction. En effet, la transduction de muscle par administration locorégionale d'AAVr n'est pas uniforme au sein des muscles du membre perfusé (Toromanoff et al. 2008), voire même au niveau d'un même muscle car la répartition du vecteur dans le muscle dépend de la géographie de l'arbre vasculaire qui est variable d'un individu à un autre. Lors des biopsies, la taille de l'échantillon prélevé est de l'ordre de 0,25 mm<sup>2</sup>, laissant pour chaque analyse (moléculaire ou histologique), un échantillon de 0,1mm<sup>2</sup>. On remarque à juste titre que les disparités de transduction sont atténuées à l'autopsie où le prélèvement post-mortem est beaucoup plus conséquent et où les analyses peuvent être réalisées sur différentes sections du muscle. Par ailleurs, les disparités de transduction musculaire observées lors de l'étude cinétique pourraient être dues à la détection de vecteur non-décapsidé encore présent dans les biopsies précoces (J7 et J30 post-injection). En effet, alors que le nombre de copies en vg/dg dans les muscles à l'autopsie ou dans les biopsies tardives est comparable d'un groupe à l'autre, ce n'est pas le cas pour les biopsies réalisées à des temps précoces. Pour toutes ces raisons, seules les biopsies à long terme et les prélèvements à l'autopsie ont été exploités.

Cependant, malgré une forte expression de la protéine GFP aussi bien dans les muscles perfusés que dans les muscles à distance, nous avons observé un phénomène inattendu

uniquement chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP. En effet, ces trois primates ont montré des lésions localisées de type ischémique dans le membre perfusé. Pour un des trois primates, il n'y a eu aucune manifestation clinique, seulement des cicatrices de lésions ischémiques observées à J90. Un deuxième primate a, quant à lui, présenté une induration de la zone poplitée à J30. Une exérèse a permis à cet animal de continuer le protocole. Par contre, le dernier primate du groupe a montré des signes cliniques beaucoup plus prononcés. En effet, il montrait une induration des muscles fléchisseurs du membre inférieur perfusé et a dû être euthanasié à un mois post-injection. Ce primate a développé une vascularite. Les analyses ont montré que ce primate présentait des lésions musculaires de type ischémique dans la zone où le cathéter a été posé, secondaire à une vascularite. Le lien avec une possible toxicité de la protéine GFP dans le muscle a été écarté car les muscles à distance de la zone du cathéter exprimaient la protéine sans induire de nécrose. Ce phénomène n'a pas été décrit chez le primate injecté par voie IM ni chez les primates injectés par voie LR avec le vecteur scAAV8-Des-GFP. Une des hypothèses est que le promoteur CMV, contrairement au promoteur desmine, a permis l'expression de la GFP dans les cellules endothéliales des parois vasculaires. Cette expression s'est révélée toxique uniquement dans ces cellules (et pas dans le muscle), résultant en des lésions vasculaires localisées au niveau de la zone d'injection. Par ailleurs, la voie d'administration couplée à l'utilisation du sérotype 8 a pu favoriser la transduction de ces cellules. Ces hypothèses restent cependant à confirmer en analysant par fluorescence directe ou immunohistochimie l'expression de la GFP dans la paroi des vaisseaux.

Contrairement aux primates injectés par voie LR, le primate injecté par voie IM a, quant à lui, montré une perte d'expression du transgène à l'échelle du transcrit et de la protéine dans le muscle injecté prélevé à l'autopsie. Du génome viral était pourtant encore détecté à ces temps tardifs. Par ailleurs, chez ce primate, la protéine était détectée dans les muscles à distance du site d'injection également à long terme (résultats non présentés). Le fait de détecter du génome viral mais plus de transcrit ni de protéine dans le muscle injecté suggère que la perte d'expression de la protéine GFP dans les fibres musculaires n'est pas exclusivement due à la destruction de ces cellules par le système immunitaire comme cela a été admis jusque là. En effet, une régulation épigénétique de l'expression du transgène pourrait également être responsable de la perte de l'expression du transgène. Un phénomène de régulation de l'expression du génome viral avait déjà été évoqué dans d'autres modèles. En effet, il a été décrit dans un modèle murin de transfert de gène à l'aide d'un vecteur

adénoviral, que l'induction d'une réponse innée induisant la production d'IFN de type I pouvait entraîner des modifications épigénétiques à l'origine d'une extinction de l'expression du transgène (Suzuki et al. 2013). L'analyse des signaux inflammatoires induits *in situ* chez le primate injecté par voie IM et la caractérisation des infiltrats musculaires au site d'injection viennent donc renforcer cette hypothèse. En effet, il semblerait qu'un plus grand nombre de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire soit exprimé dans le muscle injecté de ce primate par rapport aux primates injectés par voie LR. De plus, la caractérisation des infiltrats cellulaires dans ce même muscle révèle l'absence de LT CD8, confirmant ainsi l'absence de cytotoxicité conventionnelle. Ces résultats restent cependant à confirmer avec l'analyse de la présence de complexes d'attaque membranaire ou encore de cellules NK.

Dans notre modèle, la voie LR a permis une expression à long terme du transgène. Cependant, contrairement aux études précédentes (Toromanoff et al. 2010 ; Haurigot et al. 2010), l'analyse de la réponse immune a montré la présence d'une réponse humorale et cellulaire vis-à-vis du produit du transgène. En effet, des anticorps de type IgG dirigés contre la GFP ont été détectés dans le sérum de chacun des animaux après l'injection du vecteur. Par ailleurs, l'analyse de la réponse cellulaire a montré que les primates injectés par voie LR ont des LT qui, une fois restimulés, sécrètent de l'IFN $\gamma$  par l'intermédiaire des LT CD8 mais pas d'IL2 ni d'IL10 (5/6 primates). Par contre, le primate injecté par voie IM présente une réponse IFN $\gamma$  médiée par les LT CD4 et les LT CD8 et une réponse IL2 médiée par les LT CD4. Contrairement au profil cytokinique obtenu chez les primates injectés par voie LR (5/6 primates), celui obtenu chez le primate injecté en IM suggère la présence d'une réponse de type Th1. Cela reste cependant à confirmer par l'analyse de cytokines supplémentaires comme le TNF $\alpha$  et par l'analyse des sous-types d'IgG impliquées dans la réponse humorale.

Le fait de détecter de la protéine à long terme malgré la présence d'une réponse IFN $\gamma$  peut s'expliquer par le fait que cette cytokine, bien qu'habituellement décrite dans les réponses cytotoxiques, peut être impliquée dans des phénomènes de tolérance comme cela a été montré dans le cadre de protocoles de transplantation dans des modèles murins (Sawitzki et al. 2005 ; Hill et al. 2011). L'IFN $\gamma$  peut également induire la surexpression de marqueurs sur les cellules T impliqués dans l'initiation d'une tolérance tels que PD1 (Programmed cell death), mais aussi dans l'inhibition d'une réponse cytotoxique médiée par les LT CD8 (Calbo et al. 2008). L'IL2 est, quant à elle, décrite pour permettre la survie et la prolifération des lymphocytes. Dans un contexte d'infection par le VIH chez l'Homme, son absence peut

empêcher la prolifération de LT CD8 et donc être synonyme de l'absence d'une réponse effectrice (Zimmerli et al. 2005 ; Migueles et al. 2002 ; Kaech, Wherry, et Ahmed 2002). Ainsi, le profil cytokinique observé chez les primates LR suggère la présence de LT anergiques. En effet, les LT anergiques peuvent produire de l'IFN $\gamma$  après la rencontre avec l'APC chargée en antigène sans produire d'IL2 et peu d'IL10 (Carlin et al. 2005). Cette tolérance passive médiée par un phénomène d'anergie a d'ailleurs déjà été évoquée précédemment dans des études de transfert de gène à l'aide d'AAVr pour expliquer le maintien de l'expression du transgène en absence de LT tolérogènes proprement dits comme les T régulateurs (Kelly et al. 2009 ; Mays et al. 2013). Nos résultats soulignent par ailleurs l'importance d'étudier plusieurs cytokines pour caractériser la réponse cellulaire.

En plus de la réponse immune, des infiltrats de cellules mononuclées ont été détectés dans les membres injectés des primates injectés par voie LR sans nécrose musculaire adjacente. Ces infiltrats étaient caractérisés par la présence de LT CD4 et de LB mais pas de LT CD8 ce qui va dans le sens d'une anergie comme discuté ci-dessus. Par ailleurs, chez les primates injectés par voie LR, la détection de cellules positives pour le marqueur Foxp3 couplée à la présence de LT CD4 dans le membre injecté indiquent la présence de Treg infiltrés. En effet, Foxp3 est décrit comme un marqueur de ces cellules (Ramsdell 2003 ; Hori, Nomura, et Sakaguchi 2003). Ces données suggèrent donc un possible mécanisme de tolérance active en plus de l'anergie. Néanmoins, s'il s'avère que ces cellules sont bien des Treg, aucune indication ne nous permet cependant d'affirmer s'ils sont spécifiques de la capsid ou du produit du transgène. Pour apporter des éléments de réponse, il faudrait analyser la présence de capsides virales dans le membre injecté à long terme. Ces résultats seraient alors en accord avec ceux observés chez des patients traités par voie IM avec un vecteur AAV1 pour leur déficit en AAT. En effet, ces patients montraient un maintien de l'expression du transgène associé à la présence de Treg infiltrés dans le muscle injecté caractérisés par les marqueurs CD4 et CD25 (Mueller et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que les Treg sont spécifiques de la capsid puisque celles-ci sont encore détectées à un an post-injection *in situ*.

De manière surprenante, les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP semblaient présenter moins d'infiltrats que le groupe CMV lors d'une analyse préliminaire (uniquement à J90 post-injection pour le moment). Ces primates étaient cependant similaires aux primates injectés par voie LR avec le promoteur CMV en matière de réponse immune

humorale et cellulaire. Le promoteur et le profil d'expression de la protéine GFP ailleurs que dans le muscle pourraient donc avoir un effet sur la réponse *in situ*. De plus, le niveau d'expression de la GFP dans le muscle pourrait être déterminant puisqu'il s'est avéré (comme attendu) beaucoup plus faible avec le promoteur desmine en comparaison du CMV. Cependant, ces résultats devront être confirmés par une analyse plus poussée de l'ensemble des muscles du membre perfusé, notamment à plus long terme lors de l'autopsie future des animaux.

L'analyse de l'expression de la GFP nous a permis de montrer que la voie LR permet une expression à long terme d'une protéine immunogène dans un modèle de primate. Pour comprendre en quoi cette voie est moins immunogène que la voie IM, nous nous sommes intéressés aux interactions entre le vecteur et les organes pouvant avoir un rôle dans la modulation de la réponse immune comme le foie ou les organes lymphoïdes secondaires. Comme la réponse immune (immunogène ou tolérogène) est étroitement liée à l'environnement cytokinique, nous nous sommes donc également intéressés aux signaux inflammatoires délivrés *in situ*.

Comme cela a été montré dans des modèles murins et canins (Mingozzi et al. 2003, Mount et al. 2002), le transfert de gène dans le foie peut induire une tolérance vis-à-vis du produit du transgène. Nous nous sommes donc intéressés à la biodistribution du vecteur dans cet organe à l'échelle du génome viral et du transcrit. Nos résultats montrent que du génome viral est retrouvé dans le foie quelle que soit la voie d'administration du vecteur. Par contre, aucune différence n'a été observée concernant la quantité relative de transcrit dans cet organe entre les primates injectés par voie LR et le primate injecté par voie IM. Il semblerait donc que, dans notre modèle, le foie ne soit pas la clé du mécanisme. Néanmoins, ces observations restent à confirmer par une analyse plus poussée comprenant l'étude de l'expression de la protéine GFP dans le foie et son analyse lésionnelle.

Concernant la biodistribution du vecteur dans les ganglions lymphatiques inguinaux drainants et controlatéraux, nous avons montré que du génome viral était présent dans ces organes dès 7 jours après injection quel que soit le mode d'administration. Les ganglions non-drainants montrent un faible nombre de copies de génome viral et cette quantité est comparable d'un groupe à l'autre. Par contre, dans le ganglion drainant, le nombre de copie était compris entre 0,2 et 20 vg/dg chez les primates LR contre 100 vg/dg chez le primate IM.

Cela suggère que le drainage du vecteur ou de cellules transduites est plus important après une injection IM. Un drainage massif de vecteur pourrait entraîner l'induction de signaux inflammatoires importants et peut-être expliquer en quoi la voie LR est moins immunogène. De plus, cette différence en nombre de copie est toujours observée à l'euthanasie entre la voie LR et l'IM. Ce constat présente cependant une faiblesse : la différence de drainage du vecteur est basée sur l'observation de résultats incluant un seul primate IM. Compte-tenu de la variabilité interindividuelle, nous ne pouvons pas exclure que ce primate puisse être une exception. C'est pourquoi nous avons confirmé nos résultats en analysant les ganglions inguinaux drainants de primates injectés par voie LR (n=2) ou IM (n=2) avec un AAV8 appartenant à un autre protocole (Toromanoff et al. 2008). Les primates avaient reçu une dose de  $5 \times 10^{12}$  vg/kg et les ganglions avaient été prélevés à trois mois post-injection. Les résultats montrent également la même tendance chez un primate injecté par voie IM alors que le deuxième était comparable aux deux primates injectés par voie LR. Il est à noter qu'il serait intéressant de faire la même étude dans les ganglions lymphatiques poplités qui pourraient être plus drainants pour une des deux voies, avant de pouvoir conclure sur la différence de drainage de vecteur entre une injection IM et une administration LR. Concernant la quantité relative de transcrit, elle est comparable entre les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP que ce soit par voie LR ou IM. Nous n'avons par contre pas détecté de transcrit chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-Des-GFP confirmant ainsi la restriction du promoteur desmine à s'exprimer dans le muscle.

Comme dans l'étude consacrée à la voie IM chez la souris, en plus de l'analyse de la transduction des organes lymphoïdes secondaires, nous nous sommes intéressés à la transduction des cellules de l'immunité. Pour cela, nous avons étudié les interactions entre le vecteur AAV et les différentes populations cellulaires présentes dans les PBMC et dans la rate dans notre modèle de primate. Précédemment, les études réalisées chez le primate et chez l'Homme ont montré la capacité de l'AAV sauvage mais aussi du vecteur à transduire les PBMC (Grossman et al. 1992 ; Hernandez et al. 1999 ; Favre et al. 2001 ; Toromanoff et al. 2008 ; Manno et al. 2006). Néanmoins, ces analyses s'arrêtaient en général à la détection des génomes viraux dans les PBMC totaux. Nous nous sommes donc intéressés, cette fois, aux interactions entre le vecteur AAV et les différentes populations cellulaires présentes dans les PBMC et dans la rate.

Nos résultats montrent que ces cellules collectées à différents temps post-injection présentent toutes du génome viral en quantité plus ou moins importante. Par ailleurs, le génome de l'AAVr semble persister sous forme épisomale circulaire dans ces populations. L'analyse plus poussée de l'expression de la GFP dans les PBMC par cytométrie en flux a montré un pic d'expression de la protéine à J30 post-injection chez les primates injectés par voie LR avec un vecteur scAAV8-CMV-GFP. Compte-tenu du faible nombre de copie de génomes viraux détectés dans les fractions cellulaires, il est possible que le signal GFP détecté dans cette population ne provienne pas seulement de la transduction mais aussi de la capture de la protéine par les cellules. L'analyse de la présence de transcrit nous donnera des indications sur la transduction et l'expression du transgène dans ces cellules. L'hypothèse de la capture n'est cependant pas à exclure car ce sont les cellules capables de phagocytose qui présentent un signal important en GFP : les DC, les monocytes et les LB. Par ailleurs, le fait que le signal GFP disparaisse à J45 post-injection peut être dû à une prolifération des cellules positives et/ou à une dilution des génomes viraux présents sous forme épisomale. En effet, l'analyse plus poussée de la population présentant du signal GFP à J30 post-injection a montré que ces cellules GFP+ prolifèrent plus que les cellules GFP-. Parmi les cellules GFP+ qui prolifèrent, nous avons observé une majorité de monocytes (50 à 80%) chez les primates injectés par voie LR. Il serait donc intéressant d'étudier plus en détails le phénotype de ces cellules. Il est décrit que les monocytes se différencient en macrophages de deux types : M1 ou M2. En présence d'IFN $\gamma$  et d'IL12, les macrophages se présentent sous la forme M1 et interagissent avec les LT Th1 alors qu'en présence d'IL4 et d'IL10, les macrophages ont un phénotype M2 et interagissent avec les LT Th2 ou encore les Treg (Biswas et Mantovani 2010). Ce phénotype peut changer en fonction de l'environnement cytokinique (Stout et al. 2005). Il serait donc intéressant d'étudier le phénotype des monocytes présentant du signal GFP dans notre contexte en analysant d'une part l'expression des marqueurs CD16 et CD163, caractéristiques d'un phénotype M2 (Buechler et al. 2000) et d'autre part l'expression des marqueurs CD86 et HLA-DR qui révéleraient la présence de M1 (Kigerl et al. 2009). Un marquage intracellulaire ciblant les cytokines telles que l'IL10 ou l'IL12 pourra également être réalisé au même titre que l'analyse de l'expression de PDL-1 à la surface des monocytes. En effet, nous avons vu précédemment que ce ligand peut être impliqué dans des phénomènes de tolérance.

Il est important de noter que contrairement à un promoteur ubiquitaire, les primates injectés par voie LR avec un vecteur comprenant le promoteur desmine ne présentent pas

cette expression de la GFP à J30. Ceci montre que le promoteur desmine ne fuit pas dans le système hématopoïétique, ce qui confère un avantage d'un point de vue de l'innocuité. En revanche, l'absence de signal de la protéine GFP dans ces cellules pourrait être mise en relation avec le profil d'expression de la GFP dans les membres perfusés : les primates injectés avec le vecteur desmine présentent une expression de la GFP localisée et en plus faible quantité dans les fibres musculaires alors que les primates injectés avec le promoteur CMV, toujours par voie LR, présentent une expression de la GFP dans les fibres musculaires mais à priori aussi dans les parois des vaisseaux. Cette localisation peut peut-être favoriser la capture de protéine par les cellules circulantes. Un certain nombre d'analyses complémentaires permettra de trancher sur la question comme par exemple la quantification des transcrits dans les PBMC.

Bien que la mise en évidence d'un phénotype régulateur des cellules immunitaires puisse renseigner sur l'induction de tolérance vis-à-vis du transgène, il est possible que d'autres facteurs interviennent. C'est pourquoi, nous nous sommes également intéressés aux signaux inflammatoires pouvant être induits suite à l'administration du vecteur.

Dans la plupart des études, les signaux inflammatoires sont mesurés en analysant la présence de cytokines et de chimiokines dans le plasma dans les jours suivants l'injection. Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation notable de cytokines ou de chimiokines dans le plasma des primates injectés par voie LR aussi bien avec le promoteur CMV qu'avec le promoteur desmine dans les 30 jours suivants l'injection. Seul le primate injecté par voie IM a montré une tendance à l'augmentation de la concentration en IL8 et en TNF $\alpha$  dans son plasma entre 7 et 30 jours. Ces molécules sont décrites comme des myokine et cytokine inflammatoires respectivement (Pedersen 2011; Bradley 2008). Ces signaux sont cependant non-spécifiques et peuvent être attribués au stress engendré par la procédure d'injection (Haurigot et al. 2010).

C'est pourquoi, nous avons analysé la présence de signaux inflammatoires *in situ* : dans le membre injecté et dans le ganglion lymphatique drainant. En effet, nous avons observé que le drainage du vecteur pourrait être plus faible après une administration par voie LR qu'après une IM, au moins dans les ganglions lymphatiques inguinaux du côté injecté. Nous avons donc mesuré l'impact de cette différence sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire à l'échelle du transcrit sept jours après l'injection. Chez les primates injectés avec le vecteur scAAV8-CMV-GFP, il semblerait que certains gènes codant

pour des chimiokines et leurs récepteurs soient surexprimés quelle que soit la voie d'administration. Par contre, chez les primates injectés par voie LR avec le vecteur scAAV8-Des-GFP, aucun de ces gènes n'est surexprimé (2/3 primates). Il semblerait donc que ce soit l'expression de la protéine GFP dans ces tissus qui déclenchent une augmentation de ces signaux. En effet, la présence de transcrit de génome viral n'a pas été mise en évidence avec le promoteur desmine contrairement au promoteur CMV. Les signaux inflammatoires délivrés dans le ganglion lymphatique drainant ne semblent donc pas expliquer à eux seuls la différence entre les deux voies d'administration LR et IM.

Suite à ces observations dans le ganglion lymphatique drainant, nous avons voulu étudié la présence de ces mêmes signaux dans les membres injectés qui sont les premiers tissus exposés lors de l'injection du vecteur. Il est décrit que l'augmentation du niveau de transcrits de chimiokines après une infection virale, est observée entre 7 et 10 jours (Wareing et al. 2004; Power et al. 2001; Wareing et al. 2007). Le pic d'expression des gènes correspond généralement au moment où les infiltrats sont détectés. Pour ces analyses, nous nous sommes donc placés à J30 post-injection car c'est là qu'étaient détectés les infiltrats chez le primate injecté par voie IM. Les résultats montrent qu'un plus grand nombre de gènes semble surexprimé chez le primate injecté par voie IM. Une analyse plus poussée des gènes en question est actuellement en cours pour déterminer l'impact des signaux inflammatoires *in situ* sur la perte de l'expression du transgène après transfert de gène par voie IM, contrairement à la voie LR.

En conclusion, toute cette étude renforce l'idée que l'AAVr interagit rapidement et fortement avec le système immunitaire de l'hôte. Et ce, quel que soit le mode d'administration du vecteur. Cependant, nos résultats suggèrent que, contrairement à la voie IM, la voie LR permet d'induire une tolérance vis-à-vis du produit du transgène et que cette tolérance semble médiée par un phénomène d'anergie. En effet, la voie LR induit des signaux inflammatoires mais ceux-ci ne sont pas suffisants pour déclencher une réponse immune délétère vis-à-vis du produit du transgène. Par ailleurs, nous soulignons l'importance, d'un point de vue immunologique, de l'utilisation de promoteurs spécifiques de tissus aux dépends de promoteurs ubiquitaires.



## V. Conclusion générale et perspectives

Cette thèse a permis de fournir des données nouvelles concernant l'immunologie du transfert de gène à l'aide d'AAVr dans le muscle (**Figure 42**). Nous avons ainsi apporté des éléments de compréhension concernant d'une part l'initiation d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène après une injection par voie IM et d'autre part le caractère moins immunogène de la voie LR.

Dans un modèle de souris C57/B16, nous avons mis en évidence une biodistribution précoce du vecteur AAV de sérotype 8 dans les organes lymphoïdes secondaires après une injection par voie IM. En effet, du génome viral était détecté dès 7 jours après injection. Cette étude de biodistribution nous a également permis de mettre en évidence, pour la première fois de manière directe, la transduction de DC *in vivo*. Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'induire une réponse immune par un mécanisme de présentation directe de l'antigène aux lymphocytes en plus du mécanisme de *cross*-présentation déjà décrit. Une étude publiée récemment utilisant des séquences cibles du miR142, exprimé dans les cellules hématopoïétiques, dans le génome du vecteur appuie l'hypothèse que les deux mécanismes seraient impliqués dans la réponse immune dirigée contre le produit du transgène (Boisgerault et al. 2013).

Alors que les modèles murins nous donnent des indications concernant les mécanismes de déclenchement de la réponse immune, ils ne sont pas idéaux pour mimer ce qui passera chez le patient. En effet, les modèles murins ont souvent servi pour les preuves de concept pour le transfert de gène mais ce sont souvent révélés non-prédictifs de ce qui allait se passer chez l'Homme, notamment en terme de réaction du système immunitaire (Mingozzi et al. 2007a; Mingozzi et al. 2009). Bien que ce modèle ne soit pas le modèle idéal, il apparaît pourtant comme une étape clé dans le développement de stratégie de transfert de gène et comme primordial pour les études mécanistiques. En effet, c'est ainsi que les groupes ont pu étudier le profil de transduction des différents sérotypes de l'AAV ou encore le rôle du protéasome dans la dégradation de la capsid (C. Li et al. 2013). C'est grâce à l'utilisation de souris KO, que l'implication de la voie de signalisation TLR9/MyD88 dans la réponse innée envers l'AAV a été démontrée (Zhang et al. 2012; Sudres et al. 2012). Même si ce n'est pas

un modèle de référence en matière d'immunogénicité pour le transfert de gène à l'aide d'AAV, il nous permet de mieux comprendre la biologie du vecteur et ainsi d'avancer pour améliorer les protocoles de transfert de gènes.

Dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'absence de rejet du produit du transgène après une administration par voie LR, nous avons voulu nous placer dans un contexte plus pertinent d'un point de vue clinique. C'est donc naturellement que nous nous sommes tournés vers un modèle de gros animal : le primate. En effet, c'est dans les modèles de gros animaux que les limites liées à la réponse immune après transfert de gène sont apparues (Favre et al. 2002; Ross et al. 2006; R W Herzog et al. 2001). Ainsi, dans ce modèle, nous avons pu confirmer que même en présence d'une protéine immunogène, la voie LR permet une expression à long terme du transgène malgré l'initiation d'une réponse immune à la fois humorale et cellulaire. Les signaux inflammatoires délivrés dans le ganglion lymphatique drainant et dans le membre injecté ne semblent donc pas suffisants pour induire une réponse immune délétère. Au contraire, il semblerait que nous soyons en présence d'un phénomène d'anergie. De plus, ces observations appuient le fait que la détection d'anticorps de type IgG ou la sécrétion de cytokines décrites comme inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  ne sont pas forcément synonyme d'une réponse immune destructrice. De manière à confirmer que nous sommes bien en présence d'un phénomène d'anergie, le phénotype des cellules impliquées dans la réponse immune dirigée contre le produit du transgène reste à caractériser. Dans cette thèse, nous avons pu voir que les PBMC pouvaient être transduits *in vivo* par l'AAV dans un modèle de primate. Il reste à identifier les marqueurs exprimés à la surface des cellules présentant du signal GFP mais également à la surface des cellules répondant à l'antigène.

Par ailleurs, les différents facteurs influençant le déclenchement d'une réponse immune tels que la dose, l'état pathologique du tissu, le sérotype ou encore le promoteur ne semblent pas entrer en compte avec ce mode d'administration. En effet, les études s'intéressant à la voie LR ont montré que l'utilisation que ce soit i) d'un vecteur AAV2 codant pour le FIX canin sous contrôle du promoteur CMV à des doses allant de  $1 \times 10^{12}$  à  $8,5 \times 10^{12}$  vg/kg chez des chiens hémophiles (Haurigot et al. 2010), ii) de vecteurs AAV1 ou AAV8 codant pour le LEA29Y sous contrôle du promoteur desmine à une dose de  $5 \times 10^{12}$  vg/kg chez le primate (Toromanoff et al. 2010) ou iii) d'un vecteur AAV8 utilisant des AAV codant pour des ARN antisens sous contrôle du promoteur U7 à des doses allant de  $2,5 \times 10^{12}$  à

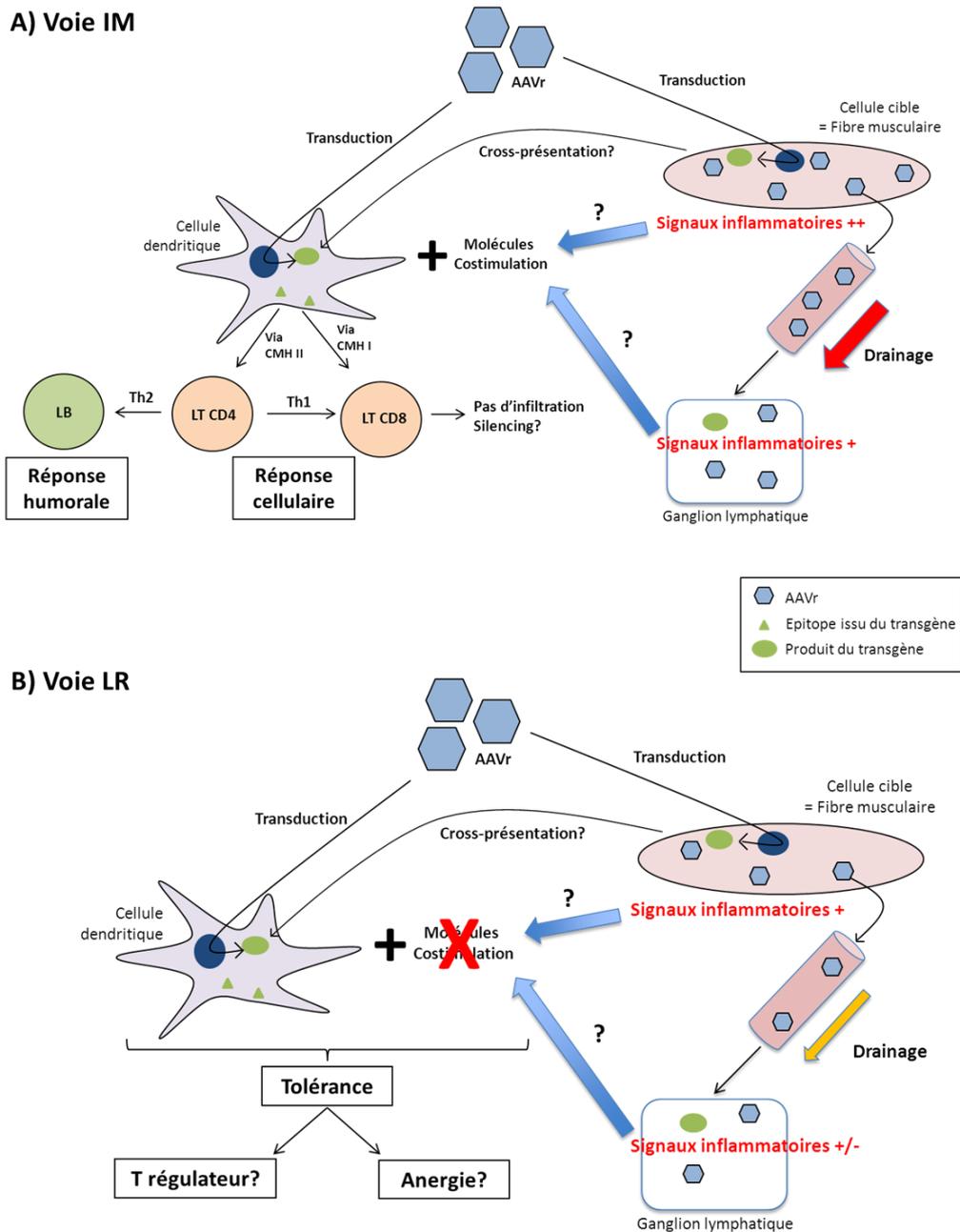
$2,5 \times 10^{13}$  vg/kg chez des chiens GRMD (Le Guiner et al. manuscrit en préparation) n'entraînait pas de rejet du produit du transgène.

Cette voie d'administration apparaît donc aujourd'hui comme prometteuse pour un transfert en clinique pour le traitement de patients. En effet, en plus de cibler un membre entier plutôt qu'un muscle donné après une administration IM, elle permet de s'affranchir d'une réponse dirigée contre le produit du transgène. Jusqu'ici, cette réponse n'avait pas posé de problème dans les essais cliniques mais des études récentes chez des patients atteints de la DMD ont montré qu'ils pouvaient présenter une réponse dirigée contre la dystrophine (Mendell et al. 2010a). L'injection du vecteur par voie LR chez ces patients pourrait alors permettre d'empêcher cette réponse immune. D'ailleurs, de plus en plus d'équipes, travaillant sur les dystrophies musculaires, envisagent ou utilisent déjà cette approche.

Enfin, bien que dans notre modèle nous ayons détecté une réponse humorale dirigée contre la capsidite du vecteur quels que soient la voie d'administration et le promoteur utilisés, nous ne savons pas quel impact cette voie peut avoir sur l'initiation d'une réponse dirigée contre la capsidite et la réactivation de cellules mémoires préexistantes, paramètre qui s'est pourtant révélé limitant lors du transfert des protocoles de thérapie génique du gros animal à l'Homme (Mingozzi et al. 2007a; Mingozzi et al. 2009). La présence de Treg infiltrés s'ils sont couplés à la présence de capsidite de l'AAV8r, dans notre modèle, peut nous faire penser à un phénomène de tolérance vis-à-vis de la capsidite mais aucun test n'a été réalisé pour déterminer leur spécificité. A ce jour, nous ne disposons pas de modèle permettant de prédire si la voie LR permet réellement de s'affranchir d'une réponse anti-capsidite délétère comme celle décrite dans l'essai clinique sur les patients hémophiles (Mingozzi et al. 2007). En effet, bien que le primate soit un hôte naturel de l'AAV, la présence d'une réponse cellulaire pré-existante contre l'AAV et son impact sur l'efficacité du transfert de gène n'ont pas été montrés. Chez l'Homme, l'utilisation de traitement immunosuppresseur est présentée comme une alternative préventive. L'administration de ce type de traitement de manière transitoire ou ponctuelle semble permettre de s'affranchir d'une réponse dirigée contre la capsidite chez l'Homme et permet de maintenir l'expression du transgène à long terme (Nathwani, Tuddenham, et al. 2011). Ces traitements immunosuppresseurs augmentent cependant le risque d'infections opportunistes. D'autres stratégies sont donc actuellement à l'étude pour moduler la réponse dirigée contre la capsidite. Des protocoles utilisant des Tregitopes (contraction de Treg et d'épitope), épitopes dérivés d'IgG stimulant l'expansion de Treg, sont

actuellement en cours de développement (De Groot et al. 2008; Cousens et al. 2013). Dans le cadre d'une réponse contre la capsid de l'AAV2, ces outils ont montré leur capacité à diminuer la réponse cytotoxique médiée par les LT CD8 et à induire l'expansion d'une population de Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> spécifiques de l'épitope de la capsid (Hui et al. 2013).

En conclusion, la voie LR apparaît donc aujourd'hui comme une voie prometteuse pour le transfert de gène dans le muscle. Néanmoins, seule la transposition de cette voie dans des protocoles cliniques pourra nous dire si elle permet de s'affranchir de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid et/ou le produit du transgène chez les patients et réellement permettre un transfert de gène efficace à long terme.



**Figure 42 : Immunologie du transfert de gène dans le muscle squelettique. A)** L'injection d'un vecteur scAAV8 par voie IM entraîne une transduction des cellules musculaires et induit des signaux inflammatoires *in situ*. Le vecteur et/ou les cellules transduites sont drainés de manière importante dans le ganglion lymphatique le plus proche où des signaux inflammatoires sont également induits. Des DC sont transduites permettant ainsi la présentation directe de l'antigène aux LT. Ces DC peuvent également capter des antigènes dérivés du transgène exprimé par les fibres musculaires, on parle alors de *cross*-présentation. Ces deux mécanismes activent les LT et aboutissent à la perte d'expression du transgène. **B)** L'injection d'un vecteur scAAV8 par voie LR entraîne une transduction des cellules musculaires et induit des signaux inflammatoires moins important *in situ* qu'après une administration par voie IM. Le vecteur et/ou les cellules transduites sont drainés de manière modérée dans le ganglion lymphatique le plus proche où des signaux inflammatoires sont induits si le transgène est exprimé (en fonction du promoteur). Les signaux inflammatoires peu ou pas présents ont un impact sur les DC transduites susceptibles de présenter l'antigène dérivé du transgène. Ces DC ne présentent pas les signaux nécessaires pour déclencher une réponse T délétère, cela aboutit à l'induction de LT anergiques et/ou régulateurs et à une expression à long terme du transgène.



# VI. Annexes

## Article

### **Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates : implications for gene doping**

W Ni, C Le Guiner, G Gernoux, M Penaud-Budloo, P Moullier and RO Snyder.

*Gene Therapy (2011) 18, 709-718*



ORIGINAL ARTICLE

# Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates: implications for gene doping

W Ni<sup>1,5</sup>, C Le Guiner<sup>2,3,5</sup>, G Gemoux<sup>2</sup>, M Penaud-Budloo<sup>1,2</sup>, P Moullier<sup>1,2,3</sup> and RO Snyder<sup>1,2,4</sup>

Legitimate uses of gene transfer technology can benefit from sensitive detection methods to determine vector biodistribution in pre-clinical studies and in human clinical trials, and similar methods can detect illegitimate gene transfer to provide sports-governing bodies with the ability to maintain fairness. Real-time PCR assays were developed to detect a performance-enhancing transgene (erythropoietin, EPO) and backbone sequences in the presence of endogenous cellular sequences. In addition to developing real-time PCR assays, the steps involved in DNA extraction, storage and transport were investigated. By real-time PCR, the vector transgene is distinguishable from the genomic DNA sequence because of the absence of introns, and the vector backbone can be identified by heterologous gene expression control elements. After performance of the assays was optimized, cynomolgus macaques received a single dose by intramuscular (IM) injection of plasmid DNA, a recombinant adeno-associated viral vector serotype 1 (rAAV1) or a rAAV8 vector expressing cynomolgus macaque EPO. Macaques received a high plasmid dose intended to achieve a significant, but not life-threatening, increase in hematocrit. rAAV vectors were used at low doses to achieve a small increase in hematocrit and to determine the limit of sensitivity for detecting rAAV sequences by single-step PCR. DNA extracted from white blood cells (WBCs) was tested to determine whether WBCs can be collaterally transfected by plasmid or transduced by rAAV vectors in this context, and can be used as a surrogate marker for gene doping. We demonstrate that IM injection of a conventional plasmid and rAAV vectors results in the presence of DNA that can be detected at high levels in blood before rapid elimination, and that rAAV genomes can persist for several months in WBCs. *Gene Therapy* (2011) **18**, 709–718; doi:10.1038/gt.2011.19; published online 10 March 2011

**Keywords:** plasmid; rAAV; white blood cells; gene doping; nonhuman primates; Taqman PCR

## INTRODUCTION

The use of performance-enhancing drugs in sports is commonly referred to by the term 'doping', particularly by those regulatory bodies overseeing sports that have made efforts to fight doping. Through the efforts of WADA (World Anti-Doping Agency) and country-specific agencies, the total tested sample number in sport games has increased because of more athletes being screened and a larger repertoire of tests for various nongene transfer agents.<sup>1</sup> Through these surveillance efforts, the integrity and fairness of sports can be protected. However, new kinds of doping approaches are possible, such as gene doping. Advances in gene transfer technology used for legitimate gene therapy and vaccination, are capable of providing the means to enhance the physical performance of athletes. According to WADA, gene doping is defined as the nontherapeutic use of genes and genetic elements that are capable of enhancing athletic performance. If gene doping is being pursued,<sup>2</sup> it would undermine principles of fair play in athletics and, most importantly, could present major health risks to athletes who partake in gene doping. One attraction of gene doping lies in the apparent difficulty in detecting its use. Gene doping is now considered a real threat to the world of sports, and it is anticipated that the few athletes seeking an advantage will want to use the latest gene transfer technology.

For legitimate gene transfer used for gene therapy and vaccination, vector biodistribution is an important parameter used to evaluate

safety in both pre-clinical and clinical studies.<sup>3,4</sup> The type of vector, the delivery method, injection schedule, route of administration and administered dose are the main variables to affect biodistribution and shedding.<sup>5–9</sup> Intramuscular (IM) injection is a convenient method owing to physical accessibility, mass of the tissue and access to the vasculature.<sup>10–12</sup> Moreover, recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors and naked plasmid are two different gene transfer systems used for IM delivery in animal models<sup>13–17</sup> and in humans.<sup>18,19</sup> Recently, regional vascular infusion of a vector to achieve skeletal muscle transduction has been reported for plasmid DNA (pDNA)<sup>20,21</sup> and for rAAV vectors.<sup>8,22</sup> Among the rAAV serotypes analyzed to date, rAAV1 and rAAV8 are among the most efficient for muscle transduction.<sup>9,23–26</sup> After IM administration, it was demonstrated that rAAV DNA resides as episomal circles<sup>27–29</sup> in a chromatin structure,<sup>30</sup> and from a biosafety perspective, the inefficient integration of rAAV into the host genome is an attractive feature for the legitimate use of this gene transfer system.

Real-time PCR is a new technology, which has been widely used in recent years,<sup>31</sup> and can detect specific DNA signals, even at a very low concentration with reliability and specificity. In addition, real-time PCR is amenable to automation and remote data collection. Here, we report the development of sensitive real-time PCR methods useful for detecting vector sequences present in blood after IM administration,

<sup>1</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA; <sup>2</sup>Laboratoire de Thérapie Génique, INSERM UMR649, IRT UN, Nantes, France; <sup>3</sup>GENETHON, Evry, France and <sup>4</sup>Department of Pediatrics, College of Medicine, University of Florida, FL, USA  
Correspondence: Dr RO Snyder, Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, 1600 SW Archer Road, Gainesville, FL 32610-0266, USA.  
E-mail: rsnyder@ocmb.ufl.edu

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 13 December 2010; revised 31 January 2011; accepted 31 January 2011; published online 10 March 2011

and determine the short- and long-term profiles after naked plasmid and rAAV vector gene transfer in nonhuman primates (NHPs). We show that rAAV sequences can be found in white blood cells (WBCs) of NHPs for several months after low-dose IM administration, but not when pDNA is administered IM at high doses. Data generated in this study will be the basis for developing a legally defensible commercial Taqman PCR assay for the detection of rAAV-mediated gene doping.

**RESULTS**

Evaluation of our screening approach to be used in humans was conducted in NHPs to closely mimic the biodistribution and longevity predicted in humans. For naked plasmid injection, a plasmid pKanaORI/PGKcmEPO was constructed. It has the cynomolgus macaque erythropoietin (*cmEPO*) gene under control of the human phosphoglycerate kinase (PGK) promoter and SV40 polyA (Figure 1a). The PGK promoter was chosen, as it is a weak promoter that is active in the muscle, to slightly increase hematocrit at a high dose of plasmid. Furthermore, the high dose of plasmid was injected to investigate the ability to transfect NHP WBCs *in vivo*.

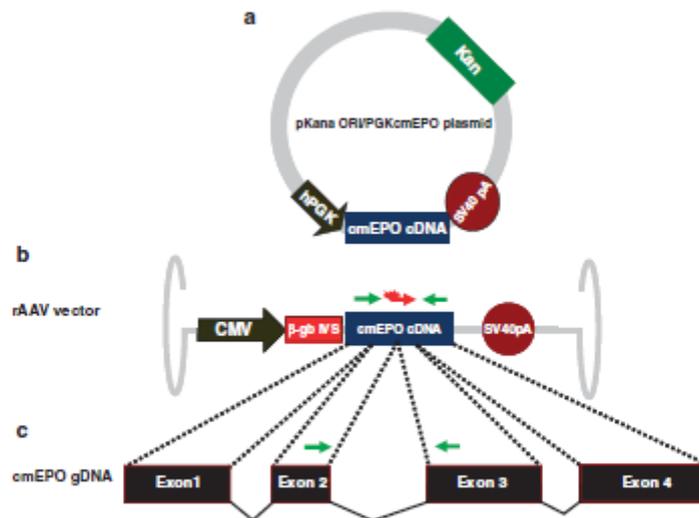
The rAAV vector transgene cassette has *cmEPO* under control of the CMV promoter and SV40 polyA (Figure 1b); the promoter is a robust promoter in the muscle known to increase hematocrit at a low vector dose.<sup>12</sup> In contrast to plasmid, previous *in vivo* studies have shown that after a single injection, rAAV genomes can be detected in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for several months.<sup>8,19</sup> Our goal in this study is to determine whether under stringent conditions (very low doses of rAAV), rAAV genomes can be detected in WBCs, which were targeted because they are easily accessible and have the potential of carrying vector sequences in the long term. Detection of low copies of plasmid and rAAV sequences in blood required the evaluation and optimization of blood collection, DNA isolation and handling, as well as PCR amplification and analysis.

**Total DNA extraction from WBCs**

DNA was extracted from WBCs instead of isolating purified PBMCs on Ficoll gradients. Our goal was to decrease the number of sample manipulations, and to increase the yield and maintain the quality of the extracted DNA, as different testing laboratories are expected to use these methods. We excluded kits that included columns or resins, because we were concerned about the competition between genomic DNA (gDNA) and the plasmid or rAAV episomes for binding. On the basis of these criteria, we decided to evaluate the Genra Puregene kit obtained from Qiagen (Courtaboeuf, France) and the Wizard kit from Promega (Charbonnières-les-Bains, France).

For kit evaluation, total DNA was extracted from the WBC fraction of 3 ml of whole blood of three naive macaques (*n*=2 for each animal). The total gDNA yield was similar with both kits. For all extracted DNA samples, the A260/280 ratios were between 1.86 and 1.91, and the A260/230 ratios were ~2.2, which is consistent with the absence of proteins and other contaminants. We obtained gDNA that seems to remain intact, although a small amount of subchromosomal size fragments can be seen by agarose gel electrophoresis (data not shown). This quality of DNA is suitable for PCR amplification, as determined by the ability to amplify by conventional PCR, an endogenous gene (*ε-globin*, see below) from 50 ng to 1 µg of DNA (data not shown).

As published previously, in NHPs, rAAV genomes persist as chromatinized large concatemeric and small monomeric circles in the skeletal muscle.<sup>30</sup> The rAAV genome structure (episomal or integrated) is unknown in WBCs; thus, we wanted to determine whether episomes could be extracted along with gDNA. We carried out blood gDNA extractions spiked with a large plasmid (35 200 bp mimicking rAAV concatemeric circles) or a small plasmid (5700 bp mimicking rAAV monomeric circles) to evaluate the efficiency of capture in the presence of excess gDNA. In brief, DNA extractions were performed from whole blood of the same noninjected NHPs, using the two kits. Overall, 3 ml blood was spiked with 3E6 copies of



**Figure 1** Plasmid and rAAV vector structures. (a) hPGK, human phosphoglycerate kinase promoter; cmEPO, cynomolgus macaque erythropoietin cDNA; SV40 pA, simian virus 40 polyadenylation site; Kan, kanamycin-resistance gene. (b) CMV, cytomegalovirus immediate early promoter; β-glob I/IS, β-globin intron; cmEPO cDNA and SV40 pA. The expression cassette was cloned between inverted terminal repeats. (c) The cmEPO genomic DNA contains four exons. The intron between exon 2 and exon 3 is the longest (583 bp) in this gene. Genetic elements are not drawn to scale.

**Table 1** Efficiency of DNA extraction

Spike	Extraction kit	Yield of the extraction ( $\mu$ g)	Copies of plasmid in 50 ng of DNA	Total copies of plasmid in the extracted DNA	Recovery of the spiked plasmid
None	Wizard	122.5	ND	ND	NA
3E6 copies of large plasmid during step 1	Wizard	106.7	13.3	2.83E4	0.9%
3E6 copies of small plasmid during step 1	Wizard	180.2	12.2	4.39E4	1.5%
3E6 copies of large plasmid during step 2	Wizard	135.4	385	1.0E6	33.3%
3E6 copies of small plasmid during step 2	Wizard	133.5	ND	ND	0%
None	Genra Puregene	139.5	ND	ND	NA
3E6 copies of large plasmid during step 1	Genra Puregene	113.9	ND	ND	0%
3E6 copies of small plasmid during step 1	Genra Puregene	144.3	34.3	9.9E4	3.3%
3E6 copies of large plasmid during step 2	Genra Puregene	149	893.5	2.5E6	83.3%
3E6 copies of small plasmid during step 2	Genra Puregene	108.5	200	4.34E5	14.5%

Abbreviations: NA, not applicable; ND, not detectable.

large or small plasmids, either at the first step of the extraction, that is, in whole blood mixed with a red blood lysis solution, or at the second step of the extraction, that is, on the white cell pellet after the first centrifugation step. The DNA yield of our extractions was between 100 and 150  $\mu$ g of total DNA for 3 ml of whole blood. A quantitative PCR analysis that is specific for plasmid sequences was performed on 10 and 50 ng of DNA, and quantified using a plasmid standard curve. Recovery of the initial spiked plasmid was then calculated (Table 1). To confirm the reliability of each extraction, the quality of the extracted DNA was checked by electrophoresis, spectrophotometry and by amplification of the  $\epsilon$ -globin gene (data not shown).

When pDNA was spiked during the first step of extraction, recovery was very low, regardless of the extraction kit. It is likely that the vast majority of the plasmid was lost after lysis of red blood cells and the subsequent centrifugation step, when the supernatant (serum) was removed from the white cell pellet. This was confirmed with the results obtained when the plasmid was spiked directly into the WBC pellet in which recovery of both spiked plasmids was higher, and the Genra Puregene DNA extraction kit was used for subsequent analyses as it was more efficient. Furthermore, capture of the larger plasmid was more efficient than that of the smaller plasmid. DNA extracted from WBCs using this method was comparable in quality and yield with DNA purified from PBMCs isolated on Ficoll gradients (data not shown).

#### Evaluation of DNA storage and transport

In our study, NHP injections, blood collection and DNA extraction were performed in Nantes (France) and the PCR analyses in Gainesville (FL, USA); hence, it was necessary to validate the stability of our DNA samples during storage and shipping. After extraction, total DNA was resuspended in Tris-EDTA buffer, stored one night at +4 °C to dissolve and then frozen at -20 °C. We favored aliquoting into 100  $\mu$ l to avoid repeated thawing and freezing cycles. One aliquot of each sample was sent to Gainesville and backup samples were archived in Nantes. The shipping was carried out at ambient temperatures at different times of the year through overnight courier to reduce the cost associated with frozen or refrigerated shipping, and samples were delivered in <72 h. Upon arrival, integrity of the DNA was determined by spectrophotometry at A<sub>260</sub> and electrophoresis. To further confirm the integrity of the DNA, all samples were subjected to real-time PCR using an assay targeting the  $\epsilon$ -globin genomic locus (Table 2), in which all gDNA samples produced similar  $\epsilon$ -globin signals before and after shipment (data not shown).

#### Taqman real-time PCR assay design

To detect the biodistribution of injected DNA sequences, sensitive and specific assays that can distinguish exogenous DNA from NHP gDNA were developed. The SV40 polyA real-time PCR assay was adapted with changes from the assay developed by Lock *et al.*<sup>32</sup> for the rAAV2 Reference Standard Material. The SV40 polyA site, which is not present in the NHP genome but is present in the naked plasmid and rAAV vectors used here, is an ideal target as there is no competition with endogenous sequences. In addition, the kanamycin-resistance cassette in the pKanaORI/PGKcmEPO plasmid provides an additional target for pDNA. Although these two sequence targets can be used to detect naked plasmid and rAAV vectors, we also want to detect the transgene (cmEPO) sequence, because when screening athletes, the other genetic elements incorporated in a vector illicitly used for performance enhancement would be unknown. As the administered cmEPO sequence is a cDNA, the exon-exon junctions are targets to distinguish exogenous DNA from endogenous gDNA. A Taqman primer-probe set was designed to span the EPO Exon 2-3 boundary with the probe hybridizing to the exon-exon junction (Figure 1). The Taqman primer-probe sets were designed and validated to specifically detect naked plasmid and rAAV vectors in the presence of excess gDNA (Table 2). To verify the amount of DNA that was analyzed in each reaction, the  $\epsilon$ -globin PCR assay was used to normalize the input DNA. As expected, EPO Exon 2-3, SV40 and Kan primer-probe sets specifically detect cmEPO cDNA, SV40 polyA and kanamycin targets, respectively, and do not produce a signal for NHP gDNA alone. Conversely, the  $\epsilon$ -globin primer-probe set detects only gDNA.

#### Efficiency and linearity of Taqman primer-probe sets

The input DNA amount was based on careful spectrophotometric measurement using an Implen nanophotometer (Implen, München, Germany). An amount of 500 ng of gDNA, equivalent to 75 000 WBCs, was analyzed in each PCR assay. To determine the possible competition from gDNA, pDNA was spiked into naive gDNA and testing was performed using Exon 2-3, SV40 and Kan assays. Standard curves were established using the pKanaORI/PGKcmEPO plasmid ranging from 10 to 10<sup>9</sup> copies in the absence or presence of 500 ng naive gDNA. As shown in Table 3, linearity is maintained over eight logs with all three primer-probe sets in the presence or absence of 500 ng gDNA. The efficiency of the EPO Exon 2-3 assay was inhibited by 10% in the presence of 500 ng gDNA and may be due to competition with gDNA for the EPO Exon 2-3 primers. Meanwhile, no competition was observed with the Kan and SV40 assays because none of the Kan and SV40 primer- and probe-binding sites exist in

**Table 2 Sequences and specificity of the Taqman primer-probe sets**

Assay	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Oligonucleotide concentration (nM)	Specificity	
			gDNA <sup>a</sup>	pDNA <sup>b</sup>
EPO Exon 2-3	Probe: 6FAM-AAGAGGATGGAGGTCCG-MGBNFQ	250	-	+
	Primer F: AATGAGATATCACCGTCCAGAC	900		
	Primer R: AGCTTCTGAGAGCAGGGCC	900		
SV40	Probe: 6FAM-AGCAATTTTCTCACTGCATTCTAGTTGGTTTGTG-TAMRA	250	-	+
	Primer F: AGCAATAGCATCAAAATTCACAA	900		
	Primer R: GACGGTTAAGATACATTGATGAGTT	900		
Kan	Probe: 6FAM-CGGCCATTTTCCA-MGBNFQ	250	-	+
	Primer F: CCACAGTCGATGAATCCAGAAA	900		
	Primer R: GCCTGCTTGCAGAAATCA	900		
α-Globin	Probe: VIC-TGCAGGCTGCCTGGCAGAAGC-TAMRA	250	+	-
	Primer F: TGGCAAGGAGTTCACCCT	900		
	Primer R: AATGGCAGCAGCAGACC	900		

Abbreviations: EPO, erythropoietin; gDNA, genomic DNA; pDNA, plasmid DNA.  
<sup>a</sup> detectable by Taqman PCR; -, not detectable by Taqman PCR.  
<sup>b</sup> 500 ng gDNA in 10 μl Tris-EDTA.  
<sup>c</sup> 100 copies of the pKanaORI/PGKcmEPO plasmid in 10 μl Tris-EDTA.

**Table 3 Efficiency and linearity of the Taqman PCR assays**

Assay	Linearity (R <sup>2</sup> ) in the absence of 500 ng DNA	Linearity (R <sup>2</sup> ) in the presence of 500 ng DNA	Efficiency (%) in the absence of 500 ng DNA	Efficiency (%) in the presence of 500 ng DNA
EPO Exon 2-3	0.985	0.979	92	82
SV40	0.999	0.996	95	92
Kan	0.995	0.992	94	90

Abbreviation: EPO, erythropoietin.

gDNA (Table 3). These two assays were considered to have the best sensitivity and serve as a reference for the EPO Exon 2-3 assay.

**False-positive and false-negative testing**

After establishing these vector-specific Taqman PCR assays, the lower limit of quantitation was determined. On the basis of the work above, we reliably detected three copies of the pKanaORI/PGKcmEPO plasmid spiked into 500 ng gDNA within 40 PCR cycles. A lack of signal at 40 cycles was defined as 'negative', and a Ct signal before 40 cycles of amplification was considered 'positive'. Overall, 500 ng of naive gDNA and the Tris-EDTA buffer by itself were used as 'no template controls'. Table 4 demonstrates that when 20 replicates were executed, the false-positive rates of each of the three assays are equal to zero. Meanwhile, when three copies of plasmids in 10 μl Tris-EDTA were tested in 15 replicates of the assay, the false-negative rates of the EPO Exon 2-3, SV40 and Kan assays in the presence of 500 ng gDNA were 13, 0 and 7%, respectively. Pipetting error most likely is the cause of false-negative results, as the Poisson distribution yields a 5% probability to pipet zero copies of the plasmid in a test sample. The results demonstrate that three copies of target plasmid in the presence of 500 ng gDNA, which is equivalent to 75 000 WBCs, are detected by the three assays, with the copy number obtained in all three assays having means of approximately three copies (Table 4).

**Naked plasmid expression and biodistribution**

Two NHPs were injected IM with 10 mg pKanaORI/PGKcmEPO at pre-tattooed sites along the tibialis anterior muscle. *In vivo* plasmid expression was evaluated by measuring hematological parameters (such as hematocrit and reticulocytes) as indirect measurements of

*in vivo* cmEPO expression. A slight increase in the number of reticulocytes was seen in Mac1 during the first week post injection (p.i.) (Figure 2a), but this increase had no effect on the hematocrit, and at 4 weeks p.i., the number of reticulocytes decreased until reaching the baseline value. No significant increase in the number of reticulocytes or hematocrit was observed in Mac2 (Figure 2b). Mac2 received some Fercobsang (a vitamin cocktail against anemia containing iron, copper, cobalt and vitamins B1, B12 and PP) between week 2 and week 10 p.i., as its basal hematocrit during this period was low (near 30%) and the animal was subjected to repetitive bleedings for our analyses. This treatment is expected to affect the hematocrit and reticulocytes levels, and could explain the variations observed in the hematological parameters of Mac2.

To directly determine whether the plasmid injection resulted in transgene expression, cmEPO protein levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay in the serum of Mac1 and Mac2 (Figure 2c). No significant increase in the cmEPO protein was observed after injection of pDNA, and the levels of cmEPO remained at basal values throughout the study. Variation in EPO levels in Mac2 could be due to anemia of this animal and due to Fercobsang treatment. As we injected 10 mg (a very high dose equal to 2.75E15 molecules) of a functional plasmid, these results were quite surprising, considering that the human PGK promoter used in this expression cassette is functional in the macaque skeletal muscle (Le Guiner C and Moullier P, unpublished data).

To track pDNA in blood, EPO Exon 2-3, SV40 and Kan assays were used to analyze WBC DNA samples obtained from Mac1 and Mac2 at different time points. All three primer-probe sets showed a similar trend in WBCs (Figures 2d and e). Copy number was detected as soon

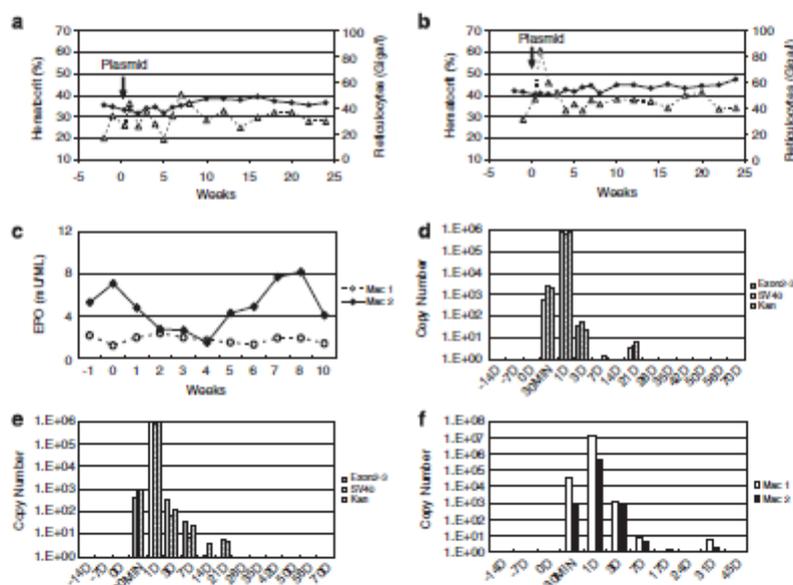
**Table 4** False-positive and false-negative rates

Assay	Negative control	False positive	False-positive rate (%)
EPO Exon 2-3	500 ng gDNA TE	0/20 0/20	0
SV40	500 ng gDNA TE	0/20 0/20	0
Kan	500 ng gDNA TE	0/20 0/20	0

Assay	Positive control	Mean copy number (s.e.)	Positive	False-negative rate (%)
EPO Exon 2-3	Three copies pDNA with 500 ng gDNA	3.2 (1.66)	13/15	13.33
	Three copies pDNA with TE	4.1 (1.34)	15/15	0
SV40	Three copies pDNA with 500 ng gDNA	3.4 (1.31)	15/15	0
	Three copies pDNA with TE	2.5 (1.78)	14/15	6.77
Kan	Three copies pDNA with 500 ng gDNA	2.8 (1.85)	14/15	6.77
	Three copies pDNA with TE	3.9 (2.13)	15/15	0

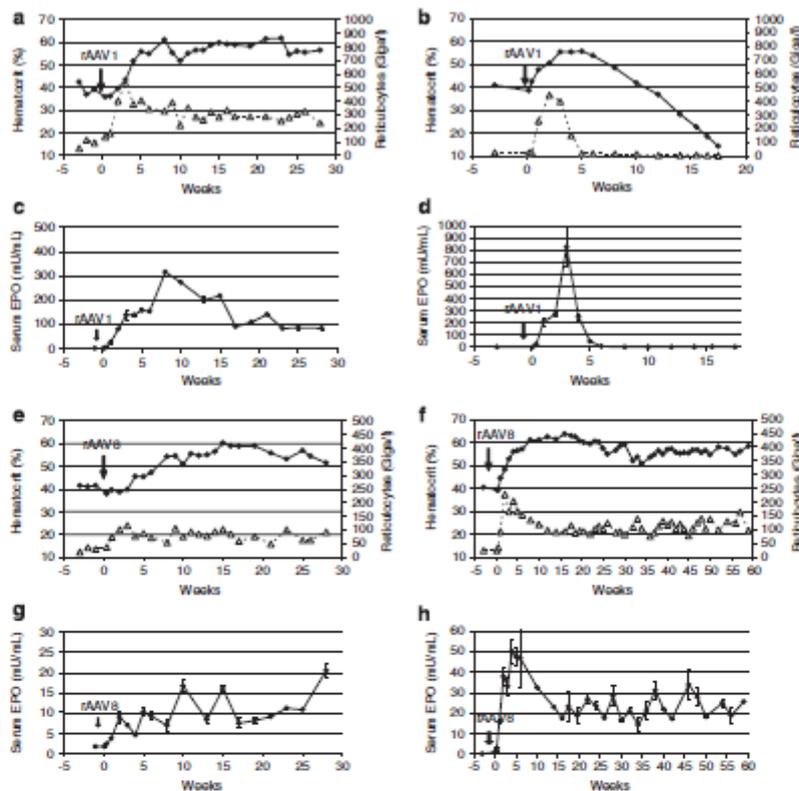
Abbreviations: EPO, erythropoietin; pDNA, plasmid DNA; s.e., standard error; TE, Tris-EDTA.



**Figure 2** Expression and biodistribution of the naked plasmid after IM injection. Hematological parameters (hematocrit in solid circles and reticulocytes in dashed open triangles) in (a) Mac1 and (b) Mac2 before and after injection. (c) Serum EPO levels of Mac1 and Mac2 before and after plasmid injection. The results are the average of three independent measurements. Copy number of the naked plasmid in white blood cells of (d) Mac1 and (e) Mac2 at different sampling times. WBC samples from Mac1 and Mac2 were analyzed by real-time PCR. The plasmid copy number is extrapolated from Exon 2-3, SV40 and Kan quantitative PCR assay standard curves. Plasmid copy numbers were normalized to gDNA using the  $\alpha$ -globin primer-probe set. (f) Plasmid copy number from the serum of Mac1 and Mac2 using the Exon 2-3 assay.

as 30 min p.i. and reached maximum at 1 day p.i., and then fell back to the pre-injected level by 1 week. The data demonstrated that the pKanaORI/PGKcmEPO plasmid enters the blood shortly after IM injection. Negative control samples (blood samples obtained from a noninjected animal sampled at the same time points as injected animals) were used to determine the background and showed no PCR signal (data not shown). Comparing the copy number from

injected and noninjected animals, we can conclude that the plasmid cannot be detected in WBCs more than 3 weeks after IM injection. Serum samples obtained from Mac1 and Mac2 were also tested for the presence of pDNA. Similar to the signal from WBCs, the copy number in the serum of both animals reached the maximum at 1 day p.i. However, the peak copy number of Mac1 is 20 times higher than that of Mac2 (Figure 2f) and pDNA in serum is cleared within 4 weeks.



**Figure 3** Hematological parameters and EPO levels in the serum of rAAV vector-injected NHP. Hematological parameters (hematocrit in solid circles and reticulocytes in dashed open triangles) in (a) Mac3, (b) Mac4, (e) Mac5 and (f) Mac6 before and after rAAV administration. Serum EPO levels of (c) Mac3, (d) Mac4, (g) Mac5 and (h) Mac6 before and after rAAV injection. The results are the average of three independent measurements. For rAAV1, Mac3 received  $2.5 \times 10^{10} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $7.75 \times 10^9 \text{ vg total}$ ) and Mac4 received  $2.5 \times 10^{11} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $9 \times 10^{10} \text{ vg total}$ ). For rAAV8, Mac5 was injected with  $5 \times 10^9 \text{ vg kg}^{-1}$  ( $1.3 \times 10^{10} \text{ vg total}$ ) and Mac6 received  $2.5 \times 10^{10} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $1.01 \times 10^{11} \text{ vg total}$ ).

To evaluate the transfection of myofibers at the site of plasmid injection, we performed PCR analysis at 3 months p.i. on muscle biopsies in the injected legs of Mac1 and Mac2. Total DNA was extracted from muscle biopsies and analyzed using the EPO Exon 2–3 assay, and we observed the presence of pDNA in the injected muscle at 3 months p.i. at copy numbers ranging from 20 to 200 per 500 ng gDNA.

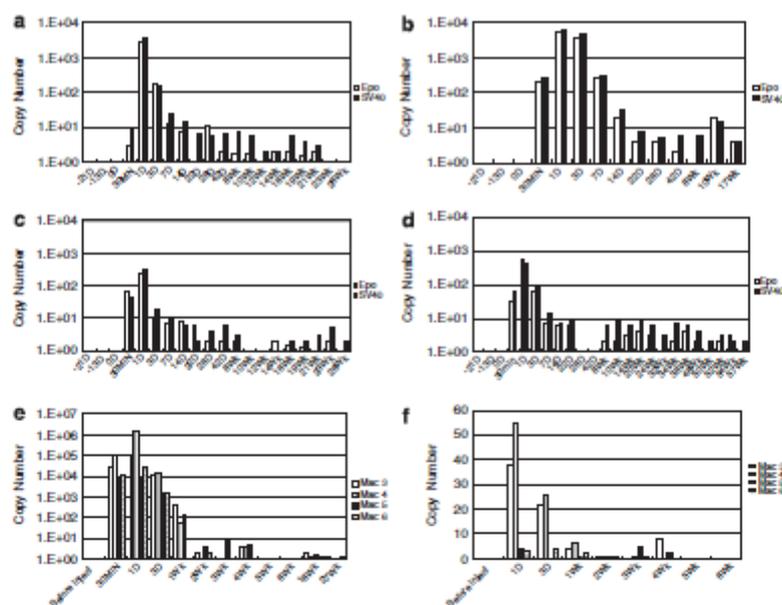
**rAAV vector expression**

Four NHPs were injected IM with low doses of rAAV1 or rAAV8 vectors harboring the same expression cassette (CMV-cmEPO-SV40pA). For rAAV1, Mac3 received  $2.5 \times 10^{10} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $7.75 \times 10^9 \text{ vg total}$ ) and Mac4 received  $2.5 \times 10^{11} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $9 \times 10^{10} \text{ vg total}$ ). For rAAV8, Mac5 was injected with  $5 \times 10^9 \text{ vg kg}^{-1}$  ( $1.3 \times 10^{10} \text{ vg total}$ ) and Mac6 received  $2.5 \times 10^{10} \text{ vg kg}^{-1}$  ( $1.01 \times 10^{11} \text{ vg total}$ ). The *in vivo* cmEPO expression of rAAV vector-injected animals was evaluated indirectly by measuring hematological parameters (such as hematocrit and reticulocytes) in each rAAV-injected animal (Figures 3a–f), and directly by measuring cmEPO secretion in the serum of each rAAV-injected animal (Figures 3c–h). In contrast to the inefficient expression from

the naked plasmid shown in Figure 2, rAAV1 and rAAV8 vectors efficiently expressed EPO in all four animals. Mac3, Mac5 and Mac6 exhibited long-term cmEPO expression, with a rapid increase in the number of reticulocytes and hematocrit levels that increased ~15% for Mac3 and Mac5, and >20% for Mac6 after rAAV injection. This 20% increase in Mac6 required scheduled bleeds each week to maintain the hematocrit level under 60% (an ethically acceptable level). For Mac4 (that received the highest vector dose), the hematocrit level increased until week 4, and the number of reticulocytes increased until week 2 and then decreased; this is in correlation with a transient increase in cmEPO in the serum of this animal in this timeframe. This animal exhibited autoimmune anemia, with the development of an immune response against autologous cmEPO (data not shown), as seen in previous studies.<sup>33,34</sup> At week 17 p.i., the hematocrit decreased below 15%, and as this phenomenon was not transient, the animal was killed at 17.5 weeks p.i.

**rAAV vector DNA in blood**

DNA samples were extracted from WBCs, serum and urine of the four rAAV-transduced macaques. Overall, 500 ng WBC gDNA was analyzed



**Figure 4** rAAV vector copy number in white blood cells, serum and urine after IM injection. Copy number of the rAAV1 vector in white blood cells of (a) Mac3 and (b) Mac4. Copy number of the rAAV8 vector in white blood cells of (c) Mac5 and (d) Mac6. The copy number of DNA is extrapolated from Exon 2–3, and SV40 quantitative PCR assay standard curves. (e) rAAV copy number in the serum of Mac3, Mac4, Mac5 and Mac6. (f) rAAV copy number in urine of Mac3, Mac4, Mac5 and 6. Vector in serum and urine was detected using the Exon 2–3 assay.

using the EPO and SV40 Taqman PCR assays. Negative control samples (blood samples obtained from noninjected animals sampled at the same time points as injected animals) were used to establish a background PCR signal. No signal was obtained from all the negative control animal samples (data not shown). Taqman PCR results illustrate (Figures 4a and d) that pre-injection samples obtained from all four rAAV-injected animals were negative for both assays and that the rAAV vector appears in WBCs 30 min after IM injection; this likely represents vector in the serum (see Figure 4e), which may contaminate WBCs at a low level. The maximum copy number in WBCs and serum occurred at 1 day p.i. and likely includes infectious rAAV detectable until 7 days p.i.<sup>8</sup> The copy number in WBCs and serum decreased sharply until 3 weeks p.i., and then approximately three copies of the vector were maintained in WBCs for >20 weeks in all primates, but not serum. Although the amount of vector DNA is low, the sensitive Taqman PCR assays developed here are capable of reliably detecting the vector genomes. As mentioned before, the SV40 assay is more efficient than the EPO Exon 2–3 assay (Table 3), so that at some time points, only the SV40 assay is capable of detecting a signal.

Similar to plasmid results (Figure 2), most of the rAAV vector genomes were cleared from serum in 5 weeks (Figure 4e). In addition, a significant amount of vector was detected in urine within the first 5 days, but no target DNA signal was observed in urine samples later than 5 weeks (Figure 4f). At 1 day p.i., vector copies in WBCs for Mac3 (rAAV1) were nearly one log greater than those seen for Mac6 (rAAV8), which received the same dose; thus, it seems that rAAV1 is more efficient to enter the circulation. Moreover, muscle gDNA samples near the injection sites from the four rAAV-injected animals

were extracted and analyzed by real-time PCR to demonstrate the successful transduction of the skeletal muscle with copy numbers ranging from 50 to 2000 per 500 ng gDNA.

**DISCUSSION**

Detection of gene doping requires methods that are reliable, sensitive and specific, using samples obtained noninvasively. Although injected plasmid and rAAV genomes can be maintained in the injected muscle for at least 3 months, it is not feasible to perform muscle biopsies on athletes, especially without knowing the location of the injection. Thus, the ideal sample should be blood, urine or serum, which the athletes are required to provide before competing. Although Baoufina *et al.*<sup>35</sup> have demonstrated that real-time PCR can be used to detect cDNA spiked into human blood; it is unknown from their study how sensitive the assay is for samples taken from animals transduced *in vivo*. The efficiency of vector escape from the injection site into the circulation, and the detection of low doses in NHPs provide the best model to test the limit of detection related to dose. Our real-time PCR assays have been used to test samples from six NHPs transduced *in vivo*, and these data provide sufficient evidence that suggests that the rAAV vector genome can be maintained in WBCs up to 57 weeks after IM injection of rAAV8 and up to 26 weeks with rAAV1 (the longest points sampled). Meanwhile, the rAAV vector in serum and urine is mostly cleared within 5 weeks p.i., similar to the clearance profile of pDNA. From these results, DNA samples extracted from WBCs should be considered as a testing target in future sport competitions.

gDNA isolated from rAAV1- and rAAV8-injected animals showed a positive signal at 21 months p.i. in purified PBMCs (data not shown), and Toromanoff *et al.*<sup>8</sup> also observed rAAV1 in PBMCs at 34 months

and rAAV8 in PBMCs at 20 months after IM injection. However, the methods used here to extract DNA from WBCs do not require PBMC isolation, which reduces (1) variability, (2) required sample volume to 3 ml (versus 5–10 ml with PBMC isolation), (3) required processing time and (4) risk of sample cross-contamination. Meanwhile, the detection methods we are applying are based on single-step real-time PCR assays, which simplify the testing procedures by avoiding both the electrophoresis detection from conventional PCR analysis and the multiple amplification steps of nested PCR.<sup>36</sup>

The biodistribution analysis of rAAV vectors in animal models and humans is usually limited to the short-term relative to possible life-long expression. Flotte *et al.*<sup>14</sup> demonstrated that rAAV1 vector genomes can be detected in mouse and rabbit blood up to 90 days after IM injection of doses  $\geq 1E13$  vg kg<sup>-1</sup> (40–2000-fold higher doses than those used here). Beiter *et al.*<sup>36</sup> also showed that rAAV vectors can be detected in mouse blood up to 56 days using a nested PCR strategy. However, comparing the mouse and rabbit models, NHPs more closely compare with human beings in the muscle structure, blood volume to mass ratio, viral receptors and immune response.<sup>16</sup> Here, we demonstrated rAAV1 and rAAV8 tropism for NHP WBCs after IM injection, although we did not assess whether transgene expression originates from infected WBCs. For Mac4, autoimmune anemia may have been facilitated by transduction of dendritic cells by the rAAV1 vector, which has been shown to be efficient at transducing this cell type.<sup>37</sup>

Manno *et al.*<sup>19</sup> successfully transduced the human liver using a rAAV2-Factor IX vector. They observed the presence of the rAAV2 vector up to 20 weeks in human PBMCs, up to 14 weeks in serum and up to 4 weeks in urine, with their highest dose (2E12 vg kg<sup>-1</sup>), which is 8–80-fold higher than the doses administered to the NHPs in this report. Brantly *et al.*<sup>38</sup> detected rAAV1 vector sequences in human blood up to 90 days after IM injection with the highest dose (1E12 vg kg<sup>-1</sup>). These groups used PCR assays with a sensitivity of 50–100 copies in the presence of 1 µg of gDNA.

The assays developed here have high sensitivity with reliable detection of three copies of target DNA sequences in the presence of 150 000 copies of host genomes. As a result, the combination of DNA isolation methods together with these assays is capable of detecting the minute amounts of vector sequences in 75 000 WBCs of NHP genomes. Five copies of vector in 500 ng gDNA, which is extracted from the equivalent of 10–15 µl of whole blood, indicate that 150 000 rAAV vector genomes are in the circulation (~300 ml), demonstrating that the rAAV vector genome can be maintained in a sub-population of WBCs in the long term. We detected the rAAV vector genome in WBCs at the lowest dose for each serotype (Mac3: rAAV1 at 2.5E10 vg kg<sup>-1</sup> (=7.75E10 vg total dose) and Mac5: rAAV8 at 5E9 vg kg<sup>-1</sup> (=1.3E10 vg total dose)) and achieved an increase in hematocrit. Athletes would potentially target similar vg kg<sup>-1</sup> equal to a 1.75E12 vg dose for rAAV1 and a 3.50E11 vg dose for AAV8 per 70 kg human.

Unlike the rAAV signal, the plasmid signal is not maintained in WBCs in the long term and fell back to baseline within a week p.i. and may not have been associated with WBCs, but instead confined to serum. A significant amount of DNA localizes to the blood before rapid elimination by the liver,<sup>39</sup> and an additional mechanism for plasmid elimination from the blood may involve kidney secretion into the urine. Furthermore, the low amount of pDNA detected 3 months after injection at the muscle site could be the result of inefficient transfection, or transduced myofiber elimination after an immune cell infiltration in response to CpG sequences found in prokaryotic sequences (that is, the plasmid backbone used here).<sup>40–42</sup>

The long-term maintenance of rAAV sequences in WBCs provides an easily accessible target for the surveillance of gene doping. The methods developed here to test gene doping also provide the basis for detecting other WADA-prohibited gene-doping targets. Furthermore, the assays developed here performed similarly in different matrices of specimens: blood, urine, muscle and serum. Our experiments in NHPs were designed to test the feasibility of detecting vector sequences in blood in the long term after IM injection and to gain insights into testing humans. Storage and shipping of DNA required validation, as athlete samples will be shipped to testing laboratories and results sent to central databases. The data generated here are being used to develop similar assays to test homologous human transgenes. Given that gene transfer technology encompasses various vectors, routes of administration, as well as injection formulations, vector biodistribution can vary widely. Thus, another outcome of our work will be to better define assays that can be used to elucidate vector distribution for legitimate gene therapy applications.

## MATERIALS AND METHODS

### Recombinant plasmid

The pKanaORI/PGKcmEPO plasmid contains the cmEPO cDNA under the control of the human PGK promoter and the SV40 polyA sequence. The backbone of the plasmid contains a kanamycin-resistance cassette and the DNA replication origin from pUC. The integrity of the plasmid was checked by complete sequencing.

For animal studies, the plasmid was amplified in *Escherichia coli* (DH5α from Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and purified using the 'Nucleobond PC 10000-EF' Endotoxin-Free DNA Plasmid kit obtained from Macherey-Nagel (Hoerd, France). Plasmid was formulated at a concentration of 7.9 mg ml<sup>-1</sup> in normal saline solution. Concentration and purity of the plasmid were checked on a nano-spectrophotometer obtained from Implen. The identity of the plasmid was verified by restriction digestion, using restriction enzymes from New England Biolabs (Saint Quentin Yvelines, France). The sterility of the plasmid was verified using the Hemoline Performance Duo kit obtained from Biomérieux (Craponne, France). The functionality of the plasmid was checked on DAIE7 cells, which are sensitive to cmEPO. In brief, 48 h after transfection of the plasmid in 293 cells, the supernatant containing cmEPO was harvested and different dilutions were added to DAIE7 cells. Forty-eight hours later, a cytotoxic test with MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma, Lyon, France) was performed on DAIE7 cells. The positive control was recombinant human EPO (Eprex, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France), and the negative control was an untransfected 293 cell supernatant.

### rAAV vector production

The pSV9-MD2-cmEPO rAAV vector plasmid harbors the cmEPO transgene under control of the CMV promoter and SV40 pA. The integrity of the plasmid was checked by complete sequencing.

The rAAV1-MD2-cmEPO and rAAV8-MD2-cmEPO vectors were prepared by transient transfection of 293 cells and purified by cesium chloride density gradients, followed by extensive dialysis against phosphate-buffered saline.<sup>43</sup> Appropriate quality control was performed to evaluate viral vector purity, vector genome titer and infectious titer.

### Animal administration and analysis

Experiments were conducted on captive-bred cynomolgus macaques purchased from BioPrim (Bazège, France). The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes (France) approved the protocol. Animals were prescreened for the presence of anti-AAV1 or anti-AAV8 antibodies, SV40 and other pathogens. All injections and blood samples were collected under ketamine-induced anesthesia (10 mg kg<sup>-1</sup>). Creatine phosphokinase levels were monitored in the six primates and all stayed in the normal range before injection and throughout the protocol after administration of the rAAV or plasmid.

**Plasmid administration**

The pKanaORI/PGFcmEPO pDNA was delivered IM to Mac1 and Mac2. The total plasmid dose was 10 mg split between two pre-tattooed injection sites along the tibialis anterior muscle in a volume of 630 µl per injection site.

**rAAV vector administration**

For direct rAAV IM injections, the total dose was split over one or two pre-tattooed injection sites along the tibialis anterior muscle in a maximal volume of 600 µl. Mac3 and Mac4 were injected with 2.5E10 and 2.5E11 vg/kg<sup>-1</sup> of the rAAV1-MD2-cmEPO vector, respectively. Mac5 and Mac6 were injected with 5E9 and 2.5E10 vg/kg<sup>-1</sup> of the rAAV8-MD2-cmEPO vector, respectively.

**DNA extraction from WBCs**

Whole blood was collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid as an anticoagulant and stored for a maximum of 4 h at room temperature or at +4 °C before DNA extraction. The first step of the protocol is lysis of red blood cells, followed by a centrifugation step to recover the WBC pellet. The supernatant (containing the serum) is removed and DNA is extracted from the WBC pellet according to the manufacturer's instructions using the Genra Puregene kit (category no. 158467) from Qiagen or using the Wizard Genomic Purification kit (category no. A1120) from Promega, which includes an RNase treatment. Concentration and purity of the gDNA were determined using a nano-spectrophotometer obtained from Implen. Integrity of the DNA was verified by migration of 3 µg of total DNA on a 0.8% agarose gel, followed by ethidium bromide staining, and by real-time PCR of the endogenous macaque  $\alpha$ -globin gene. PCR analyses were performed using GoTaq Flexi DNA polymerase from Promega and a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler from Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). The PCR program was as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 10 min. Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 3% agarose 1000 gel (Invitrogen), followed by ethidium bromide staining.

**DNA extraction from serum or urine**

Total DNA was extracted from 140 µl of serum or urine using the Qiaamp Viral RNA minikit (category no. 52904) obtained from Qiagen. One-tenth of the extraction (8 µl) was then analyzed by real-time PCR.

**DNA extraction from tissues**

Muscle biopsies were performed under ketamine (8 mg/kg<sup>-1</sup>)/metomidine (20 µg/kg<sup>-1</sup>)-induced anesthesia, and marbofloxacin and meloxicam were administered for the next 3–5 days, so as to avoid discomfort for the animal. During its anemia, Mac2 received a daily regimen of Ferocobas (0.1 ml/kg<sup>-1</sup>). gDNA was extracted as described earlier.<sup>7</sup> Concentration and purity of the gDNA were determined using a nano-spectrophotometer from Implen.

**In vivo cmEPO expression analysis**

Serum cmEPO levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Quantikine IVD kit (category no. DEP00) obtained from R&D Systems (Lille, France).

**Anti-cmEPO response analysis**

Overall, 500 ng of recombinant human EPO protein (Eprex, Janssen-Cilag) was subjected to electrophoresis on a 10% polyacrylamide SDS-PAGE gel, and then transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was then cut into strips, and after saturation, each slice was incubated with a dilution of individual macaque serum. The presence (or absence) of an anti-EPO antibody was revealed using a secondary antibody specific from NHPs (Rhesus macaca) IgG conjugated with peroxidase. The result was obtained after chemiluminescence detection. As negative controls, the serum of each animal before rAAV injection was used. As positive controls, sera from a previous animal (Denis) that has developed autoimmune anemia was used.

**Taqman PCR development**

Primers and probes were designed using ABI Primer Express 3.0. However, due to constraints of the cmEPO exon-exon junction sequences and the required Tm, screening multiple primer-probes combinations was required. Conventional PCR was first applied to test the efficiency of primer pairs and to confirm the proper PCR product (specificity). The PCR was performed in a final volume of 25 µl using Amplitaq Gold Master Mix (Applied Biosystems category no. 4318739), the forward and reverse primers described in Table 2 at a concentration of 400 nM (1×), and 500 ng of noninjected naïve macaque gDNA was spiked with different amounts of pDNA. After one cycle at 95 °C for 8 min to denature the DNA and to activate the Amplitaq Gold, the three-step program of 60 s at 95 °C, a 30 s at 56 °C and 60 s at 72 °C was used. One cycle for 2 min at 72 °C for the final extension was then performed. The PCR products were analyzed using UltraPure agarose-1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to verify the correct size of the PCR product and the absence of other bands.

Taqman real-time PCR conditions were optimized with primers and their corresponding fluorescent probes for each of the four assays. Concentrations of the 250-nm probe and 900-nm primers were found to be optimal. Overall, 500 ng of each DNA sample was amplified in a final volume of 25 µl containing 1× Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems category no. 4304337). Amplification was performed using an ABI StepOnePlus PCR machine with an initial incubation at 50 °C for 2 min, a denaturation at 95 °C for 10 min, then 40 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s and an annealing/extension step at 60 °C for 1 min. During thermal cycling, emission from each sample was recorded, and the ABI StepOne software v2.0 processed raw fluorescence data to produce threshold cycle (Ct) values for each sample.

**CONFLICT OF INTEREST**

ROS is an inventor on patents related to recombinant AAV technology. ROS owns equity in a gene therapy company that is commercializing AAV for gene therapy applications. To the extent that the work in this manuscript increases the value of these commercial holdings, ROS has a conflict of interest.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Michael L. Nickerson, PhD (NCI Frederick), Mahajoub Bello-Roufai, PhD (UF CERHB), Oumeya Adjali, MD, PhD, James Baus for helpful discussions, Yan Chérel, DVM, PhD, Béatrice Jousset, DVM, PhD, and Delphine Nivard for technical assistance, the personnel at the Boisbonne Centre (large animal facility, ONIRIS, Nantes) and the Vector Core at the University Hospital of Nantes for providing the rAAV1 and rAAV8 stocks. This project was funded by the World Anti-Doping Agency (ROS and FM), United States Anti-Doping Agency (ROS) and the Agence Française de Lutte contre le Dopage (FM). This work was performed under a Cooperative Agreement between INSERM, APM, l'Etablissement Français du Sang (EFS) and the University of Florida Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology.

- Baotina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR. Potential use of gene transfer in athletic performance enhancement. *Mol Ther* 2007; **15**: 1751–1756.
- Wells DL. Gene doping: the hype and the reality. *Br J Pharmacol* 2008; **154**: 623–631.
- Vedrier F, Descozes J. Preclinical safety evaluation of human gene therapy products. *Toxicol Sci* 1999; **47**: 9–15.
- Gonin P, Gallard C. Gene transfer vector biodistribution: pivotal safety studies in clinical gene therapy development. *Gene Therapy* 2004; **11**(Suppl 1): S98–S108.
- Provost N, Le Meur G, Weber M, Mendes-Madeira A, Podvin G, Chérel Y et al. Biodistribution of rAAV vectors following intracocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther* 2005; **11**: 275–283.
- Lil L, Davison BR, Wazay RS, Fisher KJ, Baskin GB. A preliminary evaluation of recombinant adeno-associated virus biodistribution in rhesus monkeys after intra-hepatic inoculation in utero. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 2027–2039.
- Favre D, Provost N, Blouin V, Bancho G, Chérel Y, Salvetti A et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 2001; **4**: 559–566.
- Toromanoff A, Chérel Y, Guilbaud M, Penaud-Budiau M, Snyder RD, Haskins ME et al. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (l.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* 2008; **16**: 1291–1299.

- 9 Schenk-Braat EA, van Merlo MM, Wegmaker G, Bangma CH, Kaptein LC. An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials. *J Gene Med* 2007; **9**: 910-921.
- 10 Fisher KL, Jooss K, Aldon J, Yang Y, Haedler SE, High K et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 1997; **3**: 305-312.
- 11 Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996; **70**: 8098-8108.
- 12 Snyder RO, Spratt SK, Lagarde C, Bohl D, Kaspar B, Sloan B et al. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 1891-1900.
- 13 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 2006; **14**: 316-327.
- 14 Flotte TR, Corliss TJ, Pointer A, Campbell-Thompson M, Byrne BJ. Preclinical characterization of a recombinant adeno-associated virus type 1-pseudotyped vector demonstrates dose-dependent injection site inflammation and dissemination of vector genomes to distant sites. *Hum Gene Ther* 2007; **18**: 245-256.
- 15 Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* 1991; **11**: 474-485.
- 16 Jiao S, Williams P, Berg RK, Hodgeman BA, Liu L, Repetto G et al. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 21-33.
- 17 Vigen KK, Hegge JO, Zhang G, Mukherjee R, Braun S, Grist TM et al. Magnetic resonance imaging-monitored plasmid DNA delivery in primate limb muscle. *Hum Gene Ther* 2007; **18**: 257-268.
- 18 Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; **101**: 2963-2972.
- 19 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; **12**: 342-347.
- 20 Hengge UR, Deuling B, Mirmohammadsadegh A. Safety and pharmacokinetics of naked plasmid DNA in the skin: studies on dissemination and ectopic expression. *J Invest Dermatol* 2001; **116**: 979-982.
- 21 Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budler V, Lewis DL et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther* 2004; **10**: 386-398.
- 22 Su LT, Gopal K, Wang Z, Yin X, Nelson A, Kozyk BW et al. Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* 2005; **112**: 1780-1788.
- 23 Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zillick PW, Rozmus LW et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; **105**: 1424-1430.
- 24 Van Vliet KM, Blouin V, Brument N, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Methods Mol Biol* 2008; **437**: 51-91.
- 25 Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 11854-11859.
- 26 Stroes ES, Nieman MC, Meulenbelt JJ, Franssen R, Twisk J, Henny CP et al. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 2303-2304.
- 27 Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudas L, Zhang Y et al. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 1998; **72**: 8568-8577.
- 28 Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 2003; **77**: 3495-3504.
- 29 Vincent-Lacaze N, Snyder RO, Gluzman R, Bohl D, Lagarde C, Danos O. Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol* 1999; **73**: 1949-1955.
- 30 Penaud-Budloo M, Le Güiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Chérel Y, Chenuaud P et al. Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 2008; **82**: 7875-7885.
- 31 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 165-256.
- 32 Lock M, McGormay S, Auricchio A, Ayuso E, Beecham EJ, Blouin V et al. Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material. *Hum Gene Ther* 2010; **21**: 1273-1285.
- 33 Gao G, Lubberz C, Weiner DJ, Grant R, Calcedo R, McCullough B et al. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 2004; **103**: 3300-3302.
- 34 Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Chérel Y, Casadevall N et al. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 2004; **103**: 3303-3304.
- 35 Baoutina A, Coldham T, Bains GS, Emslie KR. Gene doping detection: evaluation of approach for direct detection of gene transfer using erythropoietin as a model system. *Gene Therapy* 2010; **17**: 1022-1032.
- 36 Belter T, Zimmermann M, Frigoso A, Hudemann J, Niess AM, Bitzer M et al. Direct and long-term detection of gene doping in conventional blood samples. *Gene Therapy* 2010 (in press).
- 37 Lu Y, Song S. Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 17158-17162.
- 38 Brantly ML, Chulay JD, Wang L, Mueller C, Humphries M, Spencer LT et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AA1 gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 16363-16368.
- 39 Liu F, Shollenberger LM, Conwell CC, Yuan X, Huang L. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. *J Gene Med* 2007; **9**: 613-619.
- 40 Hughes TS, Langer SJ, Johnson KW, Chavez RA, Watkins LR, Milligan ED et al. Intrathecal injection of naked plasmid DNA provides long-term expression of secreted proteins. *Mol Ther* 2009; **17**: 88-94.
- 41 Mayhoffer P, Blaesens M, Schiaff M, Jechlinger W. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. *J Gene Med* 2008; **10**: 1253-1269.
- 42 Gill DR, Pringle IA, Hyde SC. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. *Gene Therapy* 2009; **16**: 165-171.
- 43 Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Joussemet B, Bajard H et al. 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* 2004; **9**: 410-418.



# Communication affichée

Congrès Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique (SFTCG) – Nantes, 2011

## Intramuscular AAV8 delivery in mice results in intricate vector interactions with the host immune system and dendritic cell transduction

Gernoux G.<sup>1</sup>, Guilbaud M.<sup>1</sup>, Dubreil L.<sup>2</sup>, Planel P.<sup>1</sup>, Larcher T.<sup>2</sup>, Le Guiner C.<sup>1</sup>, Moullier P.<sup>1,3</sup>, Cherel Y.<sup>2</sup>, and Adjali O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR 649, Institut de Recherche Thérapeutique, Nantes, France

<sup>2</sup>INRA UMR 703, ONIRIS, Nantes, France

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, United States

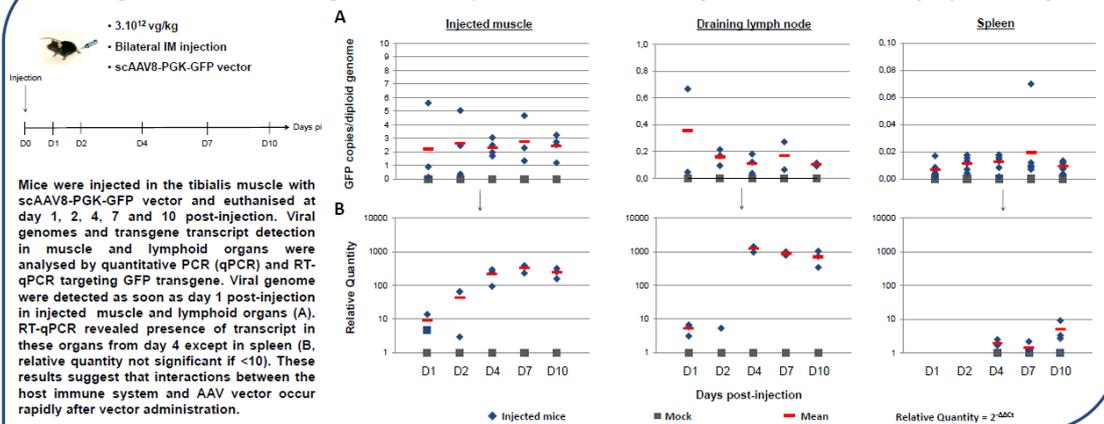


### Abstract

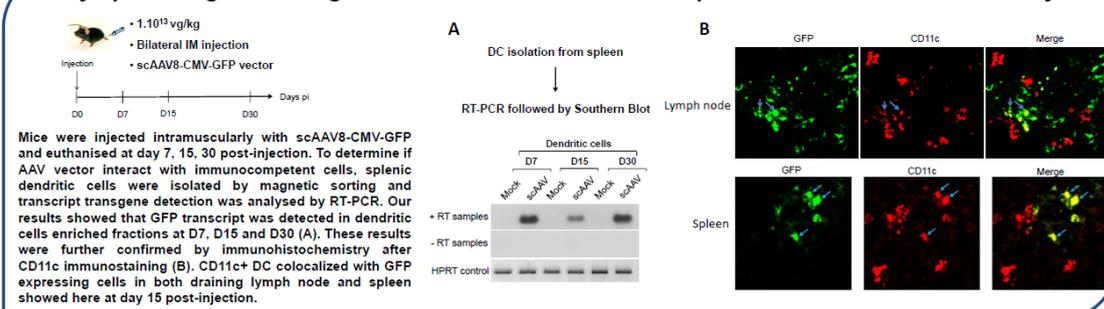
Recombinant AAV (rAAV) vectors appear to be vehicles of choice for gene transfer to the skeletal muscle. However, recent gene transfer studies into animal models and even humans indicate that the risk of transgene and/or capsid-specific immune responses is high following intramuscular (IM) rAAV delivery. It has been hypothesized that these immune responses are correlated to intricate interactions of the vector with the host immune system, due to high vector concentration at the site of injection. We explored the early relationship between the host immune system and an AAV8 vector expressing GFP, following its IM delivery in a mouse model. Kinetic of vector biodistribution and transcript detection in draining lymph nodes and spleen were analyzed and immune cell transduction was explored. We detected viral genomes as early as day 1 post-injection in lymphoid organs. Transgene transcripts were detectable from day 4 post-injection in draining lymph nodes. Interestingly, we were able to detect both viral genomes and GFP transcripts in dendritic cells (DC). DC transduction was further confirmed by immunohistochemistry in draining lymph nodes as well as spleen. Moreover, we were able to observe DC transduction, with both self complementary (sc) and single stranded (ss) AAV8 vectors. These results indicate that transgene immune rejection could be initiated by DC-mediated direct antigen presentation, in addition to the crosspresentation mechanism that was favored in early AAV studies.

### Results

#### Viral genomes and transgene transcripts are detected in injected muscle and lymphoid organs



#### Lymphoid organ residing dendritic cells are transduced upon AAV8 intramuscular delivery



### Conclusion

AAV-related immunotoxicity following skeletal muscle delivery relies on vector intricate interactions of the vector with the host immune system. After IM injection of AAV8 in mice, we showed that:

- Vector genomes were detected as early as day 1 in muscle, liver, spleen, draining as well as distant lymph nodes
- Transgene transcripts were detected from day 4 in draining lymph nodes
- DC were transduced in both spleen and draining lymph nodes
- Biodistribution profile was similar following IM delivery of a ssAAV8 vector and splenic DC transduction also observed at least at the transcript level

Next steps will consist in: • comparison with other AAV serotypes  
• study of AAV interactions with the immune system in a primate model





# Communication affichée

European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) Congress – Versailles, 2012

## Macaque immune responses following AAV-based gene transfer to the skeletal muscle : addressing the method of vector delivery

Gernoux G<sup>1</sup>, Devaux M<sup>1</sup>, Dubreil L<sup>2</sup>, Jaulin N<sup>1</sup>, Guilbaud M<sup>1</sup>, Deschamps JY<sup>2</sup>, Larcher T<sup>2</sup>, Guigand L<sup>2</sup>, Dutilleul M<sup>2</sup>, Le Guiner C<sup>1</sup>, Cherel Y<sup>2</sup>, Moullier P<sup>1,3</sup> and Adjali O<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Inserm UMR 1089, Institut de Recherche Thérapeutique, Nantes, France

<sup>2</sup>INRA UMR 703, ONIRIS, Nantes, France

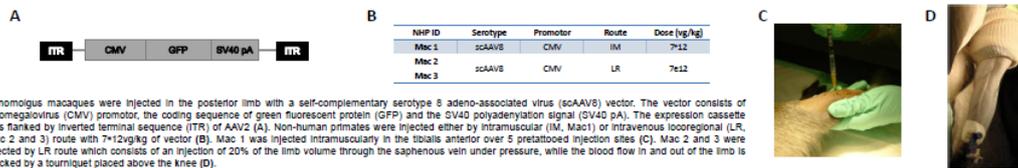
<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, United States



### Introduction

Recombinant AAV (rAAV) vectors are vehicles of choice for gene transfer to the skeletal muscle. However, translation of studies from rodents to large animals and more recently to humans indicates that the risk of transgene and/or capsid-specific immune responses is high, particularly following intramuscular (IM) rAAV delivery. As an alternative, locoregional intravenous delivery (LR) is a promising method, although still poorly addressed in large animals. In addition to a better diffusion of the vector in the muscles, LR route seems to be less immunogenic towards the transgene product than IM delivery. To confirm this hypothesis and using the macaque model, we injected an AAV8 vector encoding GFP either via IM or LR route, in the absence of any immunosuppression. To characterize the cross-talk between the AAV vector and the host immune system, vector biodistribution was analyzed in lymphoid organs. Immune responses against transgene was also monitored.

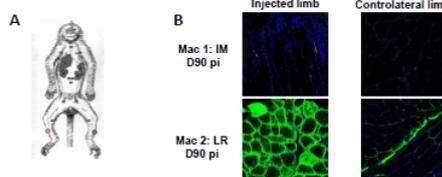
### Experimental strategy



Cynomolgus macaques were injected in the posterior limb with a self-complementary serotype 8 adeno-associated virus (scAAV8) vector. The vector consists of cytomegalovirus (CMV) promoter, the coding sequence of green fluorescent protein (GFP) and the SV40 polyadenylation signal (SV40 pA). The expression cassette was flanked by inverted terminal sequence (ITR) of AAV2 (A). Non-human primates were injected either by intramuscular (IM, Mac1) or intravenous locoregional (LR, Mac 2 and 3) route with 7x12vg/kg of vector (B). Mac 1 was injected intramuscularly in the tibialis anterior over 5 pretattooed injection sites (C). Mac 2 and 3 were injected by LR route which consists of an injection of 20% of the limb volume through the saphenous vein under pressure, while the blood flow in and out of the limb is blocked by a tourniquet placed above the knee (D).

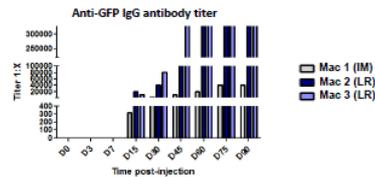
### Results

In contrast to IM, GFP protein expression is maintained until at least day 90 post-injection after LR



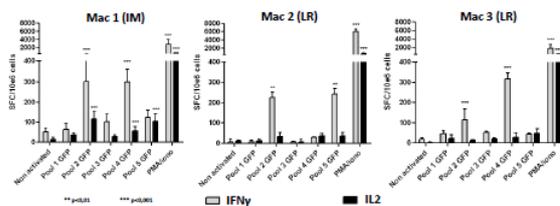
Cynomolgus macaques were injected in the posterior limb with scAAV8-CMV-GFP vector (7x12vg/kg) either by IM (Mac1) or LR (Mac 2 and 3) route. Muscle biopsies were realised at day 90 post-injection (D90 pi) in the tibialis anterior of injected (○) and contralateral (○) limbs (A). GFP protein detection was analysed by direct immunofluorescence in muscle biopsies (B). Our results show the persistence of GFP expression until at least day 90 post-injection after LR delivery, not after IM. Moreover, GFP was detected in both injected and non-injected tibialis.

Transgene persistence until day 90 after LR was associated to detection of anti-transgene IgG antibodies from day 15 post-injection



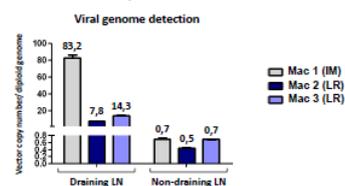
Anti-GFP IgG antibodies were analysed in primate sera by ELISA at day 0, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 post-injection. Each sample was tested in duplicates. Sample anti-IgG antibody titers were assigned at the highest dilution where the average of the duplicates was higher than the average of serum before vector injection  $\pm 2SD$ . Antibodies were detected from day 15 to at least day 90 post-injection after both IM and LR delivery. Nevertheless, anti-GFP antibody titer was higher after LR than IM delivery. For instance, titer  $>1:327680$  after LR versus  $>1:20480$  after IM at day 60 post-injection was observed for Mac 2 and Mac 1 respectively.

Transgene maintenance after LR is associated to IFN $\gamma$  but not IL2 secretion by T lymphocytes as compared to IM



Secretion of IFN $\gamma$  and IL2 from GFP-restimulated splenocytes was measured by ELISpot. Splenocytes were isolated at day 60 post-injection and stimulated *in vitro* with peptides spanning the GFP sequence organized in 5 pools. Non-activated cells consisted in negative control, whereas phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin (PMA/Iono) stimulation was used as a positive control for cytokine secretion. Responses were considered positive when the number of spot-forming colony (SFC) per million cells were  $>50$  and at least 3-fold higher than the media control (non-activated). Our results show that after LR delivery, GFP-stimulated T cells secrete IFN $\gamma$  but not IL-2. In contrast, after IM injection, stimulated T cells secrete both IFN $\gamma$  and IL-2.

10-fold lower vector draining to lymph node after LR as compared to IM



Inguinal draining and non-draining lymph nodes were surgically obtained at day 7 post-injection. Viral genomes were analysed by quantitative PCR targeting GFP transgene. The results were expressed as vector copy numbers per diploid genome and values for each sample are indicated above the corresponding bar chart. Viral genomes were detected in draining and non-draining lymph nodes for both IM and LR routes. Although GFP copy number per diploid genome was similar after IM or LR in non-draining lymph node, a difference of 10-fold copy number was observed in the draining lymph node after IM as compared to LR. These results suggest that vector and/or transduced cell lymphoid draining is higher after IM injection.

### Conclusion

After LR delivery of an AAV8 vector expressing GFP in a non-human primate, we showed detection of transgene expression until at least day 90 post-injection in contrast to IM. However, GFP maintenance at day 90 was observed despite anti-GFP IgG antibodies and T cells responding to GFP peptides. Surprisingly, GFP-restimulated T cells secreted IFN $\gamma$  but not IL2 after LR as compared to IM route where both cytokines are detected. A 10-fold lower vector copy number in draining lymph node after LR as compared to IM, could explain at least partially immune differences between the two routes.

To identify mechanisms implied in maintenance of transgene expression in our model, inflammatory signals delivered to lymph node, IgG subtypes and T cell responses will be further characterized after LR delivery. The vector biodistribution and the presence and characterization of infiltrates will also be explored *in situ*.

These results further confirm immune differences between IM and LR routes in a large animal model. The characterization of the underlying immune signals appears then critical for future translation of LR-based protocols to Humans.





# Communication affichée

American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) Congress – Salt Lake City, UT, 2013

## Locoregional intravenous delivery of AAV vector in macaque results in persistent transgene expression despite a dedicated humoral and cellular immune response

Gwladys Gemoux<sup>1</sup>, Marie Devaux<sup>1</sup>, Laurence Dubreil<sup>2</sup>, Nicolas Jaulin<sup>1</sup>, Mickael Guilbaud<sup>1</sup>, Jack-Yves Deschamps<sup>2</sup>, Thibaut Larcher<sup>2</sup>, Lydie Guigand<sup>2</sup>, Maeva Dutilleul<sup>2</sup>, Caroline Le Guiner<sup>1</sup>, Yan Chereif<sup>1</sup>, Philippe Moulhier<sup>1,3</sup> and Oumeya Adjali<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Inserm UMR 1089 Atlantic Gene Therapies, Institut de Recherche Thérapeutique, Nantes, France

<sup>2</sup>INSERM UMR 1008 Atlantic Gene Therapies, CHU ROS, Nantes, France

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, United States

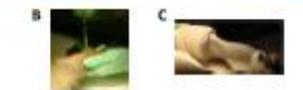


### Introduction

Locoregional intravenous delivery (LR) is a promising method to deliver recombinant adeno-associated virus (AAV) vector to large skeletal muscle territories. In addition, LR as opposed to intramuscular (IM) route of AAV administration was previously reported to allow sustained expression of rTA, an immunogenic transgene product in primates<sup>1</sup> and also promote a tolerogenic profile in factor IX-deficient dogs<sup>2</sup>. To further explore these observations, nonhuman primates (NHP) were injected by IM or LR routes with a self-complementary AAV (scAAV) vector encoding for the green-fluorescent protein (GFP). In the absence of an immunosuppressive regimen, we studied for 8 months post scAAV:GFP administration, the relationship between the AAV vector and the host immune system by analyzing vector biodistribution and transgene expression in the skeletal muscles and the lymphoid organs. The host humoral and cellular immune responses against the GFP transgene and the AAV viral capsid were also monitored at different time points after vector injection.

### Methods

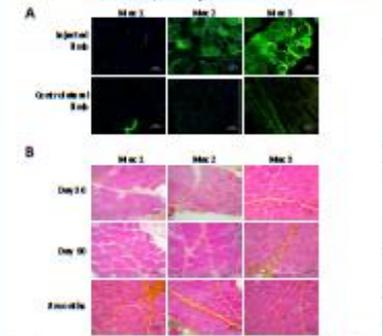
Group	Injection	Route	Time	Follow-up
Mac1	scAAV:GFP	IM	30	3 weeks
Mac2	scAAV:GFP	LR	30	3 weeks
Mac3	scAAV:GFP	LR	30	3 weeks



Mac1 (control) macaques were injected in the posterior limb with a self-complementary AAV (scAAV) vector encoding for the green fluorescent protein (GFP) in the intramuscular (IM) route. Mac2 and Mac3 macaques were injected in the posterior limb with a self-complementary AAV (scAAV) vector encoding for the green fluorescent protein (GFP) in the locoregional intravenous (LR) route. All macaques were followed up for 3 weeks after injection.

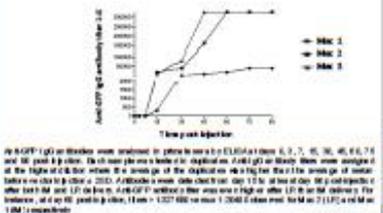
### Results

GFP transgene expression is maintained until at least 8 months post-injection after LR delivery, with delayed and mild muscle cell infiltration, as compared to IM route



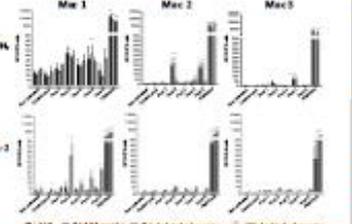
Control macaques were injected in the posterior limb with scAAV:GFP vector (10<sup>10</sup> TU/kg) either by IM (Mac1) or LR (Mac2 and Mac3) routes. Muscle biopsies were collected at day 30, day 90, and day 270 post-injection in the right or left limb of a pair of control macaques (A). GFP gene in skeletal muscle was analyzed for direct transgene access in muscle biopsies (B) and for indirect access by PCR (C). Cellular infiltrates were analyzed by immunohistochemistry (D) and for the presence of GFP expression with anti-GFP antibody (E). For each macaque, the presence of GFP expression was confirmed by PCR (F) and by immunohistochemistry (G). Mac2 and Mac3 macaques were injected in the posterior limb with scAAV:GFP vector (10<sup>10</sup> TU/kg) either by LR (Mac2) or IM (Mac3) routes.

The transgene persistence after LR was observed despite the detection of anti-GFP IgG antibodies



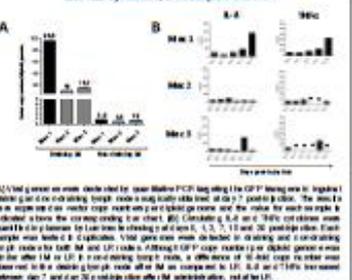
Anti-GFP IgG antibodies were analyzed in plasma sera by ELISA at days 6, 7, 10, 30, 40, 60, 70, and 90 post-injection. In all macaques, the detection of anti-GFP IgG antibodies was observed at the highest titers within the first 10 days post-injection. The detection of anti-GFP IgG antibodies was observed in all macaques at day 30 post-injection. The detection of anti-GFP IgG antibodies was observed in all macaques at day 90 post-injection. The detection of anti-GFP IgG antibodies was observed in all macaques at day 270 post-injection.

Persistent transgene expression after LR was associated with IFN $\gamma$  but not IL2 secretion



The effect of IFN- $\gamma$  and IL-2 on GFP transgene expression was assessed by ELISA. The secretion of IFN- $\gamma$  and IL-2 was measured at day 30 post-injection in the plasma sera of macaques. The secretion of IFN- $\gamma$  was significantly higher in LR macaques compared to IM macaques. The secretion of IL-2 was significantly lower in LR macaques compared to IM macaques. The secretion of IFN- $\gamma$  was significantly higher in Mac2 and Mac3 macaques compared to Mac1 macaques. The secretion of IL-2 was significantly lower in Mac2 and Mac3 macaques compared to Mac1 macaques.

Decreased lymph node vector draining after LR was associated to less secretion of inflammatory TNF $\alpha$  and IL6 cytokines, as compared to IM



Anti-AAV IgG levels were analyzed in draining lymph nodes by PCR. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 30 post-injection. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 90 post-injection. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 270 post-injection. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 30 post-injection. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 90 post-injection. The detection of anti-AAV IgG was observed in all macaques at day 270 post-injection.

### Conclusion

After LR delivery of an AAV vector expressing GFP in non-human primates, we showed detection of transgene expression until at least 8 months post-injection. Interestingly, GFP persistence after LR was observed despite the detection of anti-GFP IgG antibodies, even at higher titers than IM route, and the presence of T cells responding to GFP peptides in the spleen. Surprisingly, GFP-restimulated T cells secreted IFN $\gamma$  but not IL2 after LR as compared to IM route where both cytokines were detected. Histological analysis showed a delayed and mild inflammation in the perfused limb whereas IM injection resulted in earlier and robust muscle infiltrates at the site of injection. The characterization of these cellular infiltrates still needs to be performed. Finally, inflammatory IL8 and TNF $\alpha$  cytokines and chemokines did not increase in plasma after LR delivery in opposition to IM. All these observations suggest that immune signals induced after LR administration are not sufficient to allow fully destructive immune responses. Our observation consistent with this hypothesis is the fact that transgene copy number in the draining lymph node was found 10-fold lower in draining lymph node after LR as compared to IM.

In conclusion, this study in the nonhuman primate model further confirms the promising clinical potential of LR mode of delivery for AAV-based gene transfer to the skeletal muscle.

<sup>1</sup>Deschamps et al., Mol Ther, 2010  
<sup>2</sup>Guigand et al., Mol Ther, 2012  
<sup>3</sup>Yan et al., Mol Ther, 2012





## VII. Bibliographie

- Abbas, A K, K M Murphy, et A Sher. 1996. « Functional Diversity of Helper T Lymphocytes ». *Nature* 383 (6603) (octobre 31): 787-793. doi:10.1038/383787a0.
- Ahmad-Nejad, Parviz, Hans Häcker, Mark Rutz, Stefan Bauer, Ramunas M Vabulas, et Hermann Wagner. 2002. « Bacterial CpG-DNA and Lipopolysaccharides Activate Toll-like Receptors at Distinct Cellular Compartments ». *European Journal of Immunology* 32 (7) (juillet): 1958-1968. doi:10.1002/1521-4141(200207)32:7<1958::AID-IMMU1958>3.0.CO;2-U.
- Akache, Bassel, Dirk Grimm, Kusum Pandey, Stephen R Yant, Hui Xu, et Mark A Kay. 2006. « The 37/67-kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9 ». *Journal of Virology* 80 (19) (octobre): 9831-9836. doi:10.1128/JVI.00878-06.
- Aldrich, W A, C Ren, A F White, S-Z Zhou, S Kumar, C B Jenkins, D R Shaw, T V Strong, P L Triozzi, et S Ponnazhagan. 2006. « Enhanced Transduction of Mouse Bone Marrow-derived Dendritic Cells by Repetitive Infection with Self-complementary Adeno-associated Virus 6 Combined with Immunostimulatory Ligands ». *Gene Therapy* 13 (1) (janvier): 29-39. doi:10.1038/sj.gt.3302601.
- Alexander, I E, D W Russell, et A D Miller. 1994. « DNA-damaging Agents Greatly Increase the Transduction of Nondividing Cells by Adeno-associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 68 (12) (décembre): 8282-8287.
- Allay, James A, Susan Sleep, Scott Long, David M Tillman, Rob Clark, Gael Carney, Paolo Fagone, et al. 2011. « Good Manufacturing Practice Production of Self-complementary Serotype 8 Adeno-associated Viral Vector for a Hemophilia B Clinical Trial ». *Human Gene Therapy* 22 (5) (mai): 595-604. doi:10.1089/hum.2010.202.
- Amado, Defne, Federico Mingozzi, Daniel Hui, Jeannette L Bennicelli, Zhangyong Wei, Yifeng Chen, Erin Bote, et al. 2010. « Safety and Efficacy of Subretinal Readministration of a Viral Vector in Large Animals to Treat Congenital Blindness ». *Science Translational Medicine* 2 (21) (mars 3): 21ra16. doi:10.1126/scitranslmed.3000659.
- Arruda, V R, P A Fields, R Milner, L Wainwright, M P De Miguel, P J Donovan, R W Herzog, et al. 2001. « Lack of Germline Transmission of Vector Sequences Following Systemic Administration of Recombinant AAV-2 Vector in Males ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 4 (6) (décembre): 586-592. doi:10.1006/mthe.2001.0491.
- Arruda, Valder R, Joerg Schuettrumpf, Roland W Herzog, Timothy C Nichols, Nancy Robinson, Yasmin Lotfi, Federico Mingozzi, Weidong Xiao, Linda B Couto, et Katherine A High. 2004. « Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1 ». *Blood* 103 (1) (janvier 1): 85-92. doi:10.1182/blood-2003-05-1446.
- Arruda, Valder R, Hansell H Stedman, Timothy C Nichols, Mark E Haskins, Matthew Nicholson, Roland W Herzog, Linda B Couto, et Katherine A High. 2005. « Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term

- correction of hemophilia B in a large animal model ». *Blood* 105 (9) (mai 1): 3458-3464. doi:10.1182/blood-2004-07-2908.
- Asokan, A, J S Johnson, C Li, et R J Samulski. 2008. « Bioluminescent Virion Shells: New Tools for Quantitation of AAV Vector Dynamics in Cells and Live Animals ». *Gene Therapy* 15 (24) (décembre): 1618-1622. doi:10.1038/gt.2008.127.
- Asokan, Aravind, Julia C Conway, Jana L Phillips, Chengwen Li, Julia Hegge, Rebecca Sinnott, Swati Yadav, et al. 2010. « Reengineering a Receptor Footprint of Adeno-associated Virus Enables Selective and Systemic Gene Transfer to Muscle ». *Nature Biotechnology* 28 (1) (janvier): 79-82. doi:10.1038/nbt.1599.
- Asokan, Aravind, David V Schaffer, et R Jude Samulski. 2012. « The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (janvier 24). doi:10.1038/mt.2011.287. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273577>.
- ATCHISON, R W, B C CASTO, et W M HAMMON. 1965. « ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES ». *Science (New York, N.Y.)* 149 (3685) (août 13): 754-756.
- Balazs, Daniel A, et Wt Godbey. 2011. « Liposomes for Use in Gene Delivery ». *Journal of Drug Delivery* 2011: 326497. doi:10.1155/2011/326497.
- Banchereau, Jacques, et Ralph M. Steinman. 1998. « Dendritic Cells and the Control of Immunity ». *Nature* 392 (6673) (mars 19): 245-252. doi:10.1038/32588.
- Bartlett, J S, R Wilcher, et R J Samulski. 2000. « Infectious Entry Pathway of Adeno-associated Virus and Adeno-associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 74 (6) (mars): 2777-2785.
- Bartoli, Marc, Carinne Roudaut, Samia Martin, Françoise Fougerousse, Laurence Suel, Jérôme Poupiot, Evelyne Gicquel, Fanny Noulet, Olivier Danos, et Isabelle Richard. 2006. « Safety and Efficacy of AAV-mediated Calpain 3 Gene Transfer in a Mouse Model of Limb-girdle Muscular Dystrophy Type 2A ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (2) (février): 250-259. doi:10.1016/j.ymthe.2005.09.017.
- Bennett, Jean, Manzar Ashtari, Jennifer Wellman, Kathleen A Marshall, Laura L Cyckowski, Daniel C Chung, Sarah McCague, et al. 2012. « AAV2 Gene Therapy Readministration in Three Adults with Congenital Blindness ». *Science Translational Medicine* 4 (120) (février 8): 120ra15. doi:10.1126/scitranslmed.3002865.
- Bish, Lawrence T, Meg M Sleeper, Sean C Forbes, Bingjing Wang, Caryn Reynolds, Gretchen E Singletary, Dennis Trafny, et al. 2012. « Long-term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-mediated Exon Skipping ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (3) (mars): 580-589. doi:10.1038/mt.2011.264.
- Biswas, Subhra K, et Alberto Mantovani. 2010. « Macrophage Plasticity and Interaction with Lymphocyte Subsets: Cancer as a Paradigm ». *Nature Immunology* 11 (10) (octobre): 889-896. doi:10.1038/ni.1937.
- Bluestone, Jeffrey A, et Abul K Abbas. 2003. « Natural Versus Adaptive Regulatory T Cells ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (3) (mars): 253-257. doi:10.1038/nri1032.
- Boasso, Adriano, Andrew W Hardy, Alan L Landay, Jeffrey L Martinson, Stephanie A Anderson, Matthew J Dolan, Mario Clerici, et Gene M Shearer. 2008. « PDL-1 Upregulation on Monocytes and T Cells by HIV via Type I Interferon: Restricted Expression of Type I Interferon Receptor by CCR5-expressing Leukocytes ». *Clinical*

- Immunology (Orlando, Fla.)* 129 (1) (octobre): 132-144. doi:10.1016/j.clim.2008.05.009.
- Bohl, D, A Salvetti, P Moullier, et J M Heard. 1998. « Control of Erythropoietin Delivery by Doxycycline in Mice after Intramuscular Injection of Adeno-associated Vector ». *Blood* 92 (5) (septembre 1): 1512-1517.
- Boisgerault, Florence, David-Alexandre Gross, Maxime Ferrand, Jérôme Poupiot, Sylvie Darocha, Isabelle Richard, et Anne Galy. 2013. « Prolonged Gene Expression in Muscle Is Achieved Without Active Immune Tolerance Using MicrorRNA 142.3p-regulated rAAV Gene Transfer ». *Human Gene Therapy* 24 (4) (avril): 393-405. doi:10.1089/hum.2012.208.
- Bonham, C Andrew, Lansha Peng, Xiaoyan Liang, Zongyou Chen, Lianfu Wang, Linlin Ma, Holger Hackstein, et al. 2002. « Marked Prolongation of Cardiac Allograft Survival by Dendritic Cells Genetically Engineered with NF-kappa B Oligodeoxynucleotide Decoys and Adenoviral Vectors Encoding CTLA4-Ig ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (6) (septembre 15): 3382-3391.
- Bostick, B, A Ghosh, Y Yue, C Long, et D Duan. 2007. « Systemic AAV-9 Transduction in Mice Is Influenced by Animal Age but Not by the Route of Administration ». *Gene Therapy* 14 (22) (novembre): 1605-1609. doi:10.1038/sj.gt.3303029.
- Boutin, Sylvie, Virginie Monteilhet, Philippe Veron, Christian Leborgne, Olivier Benveniste, Marie Françoise Montus, et Carole Masurier. 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 (6) (juin): 704-712. doi:10.1089/hum.2009.182.
- Bowles, Dawn E, Scott Wj McPhee, Chengwen Li, Steven J Gray, Jade J Samulski, Angelique S Camp, Juan Li, et al. 2012. « Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (2) (février): 443-455. doi:10.1038/mt.2011.237.
- Boyton, Rosemary J, et Daniel M Altmann. 2002. « Is Selection for TCR Affinity a Factor in Cytokine Polarization? ». *Trends in Immunology* 23 (11) (novembre): 526-529.
- Bradley, J R. 2008. « TNF-mediated Inflammatory Disease ». *The Journal of Pathology* 214 (2) (janvier): 149-160. doi:10.1002/path.2287.
- Brantly, Mark L, Jeffrey D Chulay, Lili Wang, Christian Mueller, Margaret Humphries, L Terry Spencer, Farshid Rouhani, et al. 2009. « Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (38) (septembre 22): 16363-16368. doi:10.1073/pnas.0904514106.
- Brantly, Mark L, L Terry Spencer, Margaret Humphries, Thomas J Conlon, Carolyn T Spencer, Amy Poirier, Wendy Garlington, et al. 2006. « Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults ». *Human gene therapy* 17 (12) (décembre): 1177-1186. doi:10.1089/hum.2006.17.1177.
- Brockstedt, D G, G M Podsakoff, L Fong, G Kurtzman, W Mueller-Ruchholtz, et E G Engleman. 1999. « Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 92 (1) (juillet): 67-75. doi:10.1006/clim.1999.4724.
- Brown, Brian D, Bernhard Gentner, Alessio Cantore, Silvia Colleoni, Mario Amendola, Anna Zingale, Alessia Baccarini, Giovanna Lazzari, Cesare Galli, et Luigi Naldini. 2007.

- « Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state ». *Nature Biotechnology* 25 (12) (décembre): 1457-1467. doi:10.1038/nbt1372.
- Buechler, C., M. Ritter, E. Orsó, T. Langmann, J. Klucken, et G. Schmitz. 2000. « Regulation of Scavenger Receptor CD163 Expression in Human Monocytes and Macrophages by Pro- and Antiinflammatory Stimuli. » *Journal of Leukocyte Biology* 67 (1) (janvier 1): 97-103.
- Bushman, Frederic D. 2007. « Retroviral Integration and Human Gene Therapy ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (8) (août): 2083-2086. doi:10.1172/JCI32949.
- Calbo, Sébastien, Héloïse Delagrèverie, Christophe Arnoult, François-Jérôme Authier, François Tron, et Olivier Boyer. 2008. « Functional Tolerance of CD8+ T Cells Induced by Muscle-specific Antigen Expression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (1) (juillet 1): 408-417.
- Calcedo, Roberto, Uta Griesenbach, Daniel J Dorgan, Samia Soussi, A Christopher Boyd, Jane C Davies, Tracy E Higgins, et al. 2013. « Self-reactive CFTR T-cells in Humans: Implications for Gene Therapy ». *Human Gene Therapy. Clinical Development* (juin 21). doi:10.1089/humc.2012.249.
- Calcedo, Roberto, Hiroki Morizono, Lili Wang, Robert McCarter, Jianping He, David Jones, Mark L Batshaw, et James M Wilson. 2011. « Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children and adolescents ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* (juillet 20). doi:10.1128/CVI.05107-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775517>.
- Calcedo, Roberto, Luk H Vandenberghe, Guangping Gao, Jianping Lin, et James M Wilson. 2009. « Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses ». *The Journal of Infectious Diseases* 199 (3) (février 1): 381-90. doi:10.1086/595830.
- Carlin, Leo M, Kumiko Yanagi, Adrienne Verhoef, Esther N M Nolte-'t Hoen, John Yates, Leanne Gardner, Jonathan Lamb, Giovanna Lombardi, Margaret J Dallman, et Daniel M Davis. 2005. « Secretion of IFN-gamma and Not IL-2 by Anergic Human T Cells Correlates with Assembly of an Immature Immune Synapse ». *Blood* 106 (12) (décembre 1): 3874-3879. doi:10.1182/blood-2005-03-0996.
- Cartier, Nathalie, Salima Hacein-Bey-Abina, Cynthia C Bartholomae, Gabor Veres, Manfred Schmidt, Ina Kutschera, Michel Vidaud, et al. 2009. « Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-linked Adrenoleukodystrophy ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954) (novembre 6): 818-823. doi:10.1126/science.1171242.
- Cawood, Ryan, Thomas Hills, Suet Ling Wong, Aliaa A. Alamoudi, Storm Beadle, Kerry D. Fisher, et Leonard W. Seymour. 2012. « Recombinant viral vaccines for cancer ». *Trends in Molecular Medicine* 18 (9) (septembre): 564-574. doi:10.1016/j.molmed.2012.07.007.
- Cecchini, Sylvain, Tamas Virag, et Robert M Kotin. 2011. « Reproducible High Yields of Recombinant Adeno-associated Virus Produced Using Invertebrate Cells in 0.02- to 200-liter Cultures ». *Human Gene Therapy* 22 (8) (août): 1021-1030. doi:10.1089/hum.2010.250.
- Chadeuf, Gilliane, Carine Ciron, Philippe Moullier, et Anna Salvetti. 2005. « Evidence for Encapsidation of Prokaryotic Sequences During Recombinant Adeno-associated Virus Production and Their in Vivo Persistence after Vector Delivery ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 12 (4) (octobre): 744-753. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.003.

- Chao, H, Y Liu, J Rabinowitz, C Li, R J Samulski, et C E Walsh. 2000. « Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2 (6) (décembre): 619-623. doi:10.1006/mthe.2000.0219.
- Chenuaud, Pierre, Thibaut Larcher, Joseph E Rabinowitz, Nathalie Provost, Béatrice Joussemet, Hermann Bujard, Richard J S Samulski, David Favre, et Philippe Moullier. 2004a. « 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 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 9 (3) (mars): 410-418. doi:10.1016/j.ymthe.2003.12.015.
- Chenuaud, Pierre, Thibaut Larcher, Joseph E Rabinowitz, Nathalie Provost, Yan Cherel, Nicole Casadevall, Richard J Samulski, et Philippe Moullier. 2004b. « Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy ». *Blood* 103 (9) (mai 1): 3303-4. doi:10.1182/blood-2003-11-3845.
- Chirmule, N, K Propert, S Magosin, Y Qian, R Qian, et J Wilson. 1999. « Immune Responses to Adenovirus and Adeno-associated Virus in Humans ». *Gene Therapy* 6 (9) (septembre): 1574-1583. doi:10.1038/sj.gt.3300994.
- Chirmule, N, W Xiao, A Truneh, M A Schnell, J V Hughes, P Zoltick, et J M Wilson. 2000. « Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle ». *Journal of Virology* 74 (5) (mars): 2420-2425.
- Clark, K R, T J Sferra, W Lo, G Qu, R Chen, et P R Johnson. 1999. « Gene Transfer into the CNS Using Recombinant Adeno-associated Virus: Analysis of Vector DNA Forms Resulting in Sustained Expression ». *Journal of Drug Targeting* 7 (4) (décembre): 269-283. doi:10.3109/10611869909085510.
- Collaco, Roy F, Vivian Kalman-Maltese, Andrew D Smith, John David Dignam, et James P Trempe. 2003. « A Biochemical Characterization of the Adeno-associated Virus Rep40 Helicase ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36) (septembre 5): 34011-34017. doi:10.1074/jbc.M301537200.
- Cordier, L, G P Gao, A A Hack, E M McNally, J M Wilson, N Chirmule, et H L Sweeney. 2001. « Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies ». *Human Gene Therapy* 12 (2) (janvier 20): 205-215. doi:10.1089/104303401750061267.
- Cousens, Leslie P, Nader Najafian, Federico Mingozzi, Wassim Elyaman, Bruce Mazer, Leonard Moise, Timothy J Messitt, et al. 2013. « In Vitro and in Vivo Studies of IgG-derived Treg Epitopes (Tregitopes): a Promising New Tool for Tolerance Induction and Treatment of Autoimmunity ». *Journal of Clinical Immunology* 33 Suppl 1 (janvier): S43-49. doi:10.1007/s10875-012-9762-4.
- Coutelle, C, et R Williamson. 1996. « Liposomes and Viruses for Gene Therapy of Cystic Fibrosis ». *Journal of Aerosol Medicine: The Official Journal of the International Society for Aerosols in Medicine* 9 (1): 79-88.
- Dayton, Robert D, David B Wang, et Ronald L Klein. 2012. « The Advent of AAV9 Expands Applications for Brain and Spinal Cord Gene Delivery ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 12 (6) (juin): 757-766. doi:10.1517/14712598.2012.681463.
- De Groot, Anne S, Leonard Moise, Julie A McMurry, Erik Wambre, Laurence Van Overtvelt, Philippe Moingeon, David W Scott, et William Martin. 2008. « Activation of Natural Regulatory T Cells by IgG Fc-derived Peptide “Tregitopes” ». *Blood* 112 (8) (octobre 15): 3303-3311. doi:10.1182/blood-2008-02-138073.

- De Oliveira, Anna Paula, et Cornel Fraefel. 2010. « Herpes Simplex Virus Type 1/adeno-associated Virus Hybrid Vectors ». *The Open Virology Journal* 4: 109-122. doi:10.2174/1874357901004030109.
- Di Pasquale, Giovanni, Beverly L Davidson, Colleen S Stein, Inês Martins, Dominic Scudiero, Anne Monks, et John A Chiorini. 2003. « Identification of PDGFR as a Receptor for AAV-5 Transduction ». *Nature Medicine* 9 (10) (octobre): 1306-1312. doi:10.1038/nm929.
- Dong, J Y, P D Fan, et R A Frizzell. 1996. « Quantitative Analysis of the Packaging Capacity of Recombinant Adeno-associated Virus ». *Human Gene Therapy* 7 (17) (novembre 10): 2101-2112. doi:10.1089/hum.1996.7.17-2101.
- Duan, D, P Sharma, J Yang, Y Yue, L Dudus, Y Zhang, K J Fisher, et J F Engelhardt. 1998. « Circular Intermediates of Recombinant Adeno-associated Virus Have Defined Structural Characteristics Responsible for Long-term Episomal Persistence in Muscle Tissue ». *Journal of Virology* 72 (11) (novembre): 8568-8577.
- Edwards, Lindsay J, et Brian D Evavold. 2011. « T Cell Recognition of Weak Ligands: Roles of Signaling, Receptor Number, and Affinity ». *Immunologic Research* 50 (1) (mai): 39-48. doi:10.1007/s12026-011-8204-3.
- Erles, K, P Seböková, et J R Schlehofer. 1999. « Update on the Prevalence of Serum Antibodies (IgG and IgM) to Adeno-associated Virus (AAV) ». *Journal of Medical Virology* 59 (3) (novembre): 406-411.
- Faust, Susan M, Peter Bell, Benjamin J Cutler, Scott N Ashley, Yanqing Zhu, Joseph E Rabinowitz, et James M Wilson. 2013. « CpG-depleted Adeno-associated Virus Vectors Evade Immune Detection ». *The Journal of Clinical Investigation* (juin 17). doi:10.1172/JCI68205.
- Favre, D, N Provost, V Blouin, G Blancho, Y Chérel, A Salvetti, et P Moullier. 2001. « Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 4 (6) (décembre): 559-66. doi:10.1006/mthe.2001.0494.
- Favre, David, Véronique Blouin, Nathalie Provost, Radec Spisek, Françoise Porrot, Delphine Bohl, Frederic Marmé, et al. 2002. « Lack of an Immune Response Against the Tetracycline-dependent Transactivator Correlates with Long-term Doxycycline-regulated Transgene Expression in Nonhuman Primates after Intramuscular Injection of Recombinant Adeno-associated Virus ». *Journal of Virology* 76 (22) (novembre): 11605-11611.
- Ferrari, F K, T Samulski, T Shenk, et R J Samulski. 1996. « Second-strand Synthesis Is a Rate-limiting Step for Efficient Transduction by Recombinant Adeno-associated Virus Vectors ». *Journal of Virology* 70 (5) (mai): 3227-3234.
- Fire, A, S Xu, M K Montgomery, S A Kostas, S E Driver, et C C Mello. 1998. « Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans* ». *Nature* 391 (6669) (février 19): 806-811. doi:10.1038/35888.
- Flanigan, Kevin, Katie Campbell, Laurence Viollet, Wei Wang, Ana Maria Gomez, Christopher Walker, et Jerry R Mendell. 2013. « Anti-dystrophin T-cell Responses in Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and a Glucocorticoid Treatment Effect ». *Human Gene Therapy Methods* (juin 27). doi:10.1089/hgtb.2013.092.
- Flotte, Terence R. 2007. « Gene Therapy: The First Two Decades and the Current State-of-the-art ». *Journal of Cellular Physiology* 213 (2) (novembre): 301-305. doi:10.1002/jcp.21173.

- Flotte, Terence R, Bruce C Trapnell, Margaret Humphries, Brenna Carey, Roberto Calcedo, Farshid Rouhani, Martha Campbell-Thompson, et al. 2011. « Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-associated Virus Vector Expressing Alpha 1 Antitrypsin: Interim Results ». *Human Gene Therapy* (mai 24). doi:10.1089/hum.2011.053. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609134>.
- Fougerousse, Françoise, Marc Bartoli, Jérôme Poupiot, Ludovic Arandel, Muriel Durand, Nicolas Guerchet, Evelyne Gicquel, Olivier Danos, et Isabelle Richard. 2007. « Phenotypic Correction of Alpha-sarcoglycan Deficiency by Intra-arterial Injection of a Muscle-specific Serotype 1 rAAV Vector ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (1) (janvier): 53-61. doi:10.1038/sj.mt.6300022.
- Franco, Luis M, Baodong Sun, Xiaoyi Yang, Andrew Bird, Haoyue Zhang, Ayn Schneider, Talmage Brown, et al. 2005. « Evasion of Immune Responses to Introduced Human Acid Alpha-glucosidase by Liver-restricted Expression in Glycogen Storage Disease Type II ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 12 (5) (novembre): 876-884. doi:10.1016/j.ymthe.2005.04.024.
- Gao, Guangping, Mauricio R Alvira, Suryanarayan Somanathan, You Lu, Luk H Vandenberghe, John J Rux, Roberto Calcedo, Julio Sanmiguel, Zahra Abbas, et James M Wilson. 2003. « Adeno-associated Viruses Undergo Substantial Evolution in Primates During Natural Infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (10) (mai 13): 6081-6086. doi:10.1073/pnas.0937739100.
- Gao, Guang-Ping, Mauricio R Alvira, Lili Wang, Roberto Calcedo, Julie Johnston, et James M Wilson. 2002. « Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18) (septembre 3): 11854-11859. doi:10.1073/pnas.182412299.
- Gao, Guangping, Corinna Lebherz, Daniel J Weiner, Rebecca Grant, Roberto Calcedo, Beth McCullough, Adam Bagg, Yi Zhang, et James M Wilson. 2004a. « Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques ». *Blood* 103 (9) (mai 1): 3300-2. doi:10.1182/blood-2003-11-3852.
- Gao, Guangping, Luk H Vandenberghe, Mauricio R Alvira, You Lu, Roberto Calcedo, Xiangyang Zhou, et James M Wilson. 2004b. « Clades of Adeno-associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues ». *Journal of Virology* 78 (12) (juin): 6381-6388. doi:10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004.
- Gao, Guangping, Qiang Wang, Roberto Calcedo, Lauren Mays, Peter Bell, Lili Wang, Luk H Vandenberghe, et al. 2009. « Adeno-associated virus-mediated gene transfer to nonhuman primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses ». *Human Gene Therapy* 20 (9) (septembre): 930-942. doi:10.1089/hum.2009.060.
- Gaudet, D, J Méthot, S Déry, D Brisson, C Essiembre, G Tremblay, K Tremblay, et al. 2013. « Efficacy and Long-term Safety of Alipogene Tiparvovec (AAV1-LPLS447X) Gene Therapy for Lipoprotein Lipase Deficiency: An Open-label Trial ». *Gene Therapy* 20 (4) (avril): 361-369. doi:10.1038/gt.2012.43.
- Georg-Fries, B, S Biederlack, J Wolf, et H zur Hausen. 1984. « Analysis of Proteins, Helper Dependence, and Seroepidemiology of a New Human Parvovirus ». *Virology* 134 (1) (avril 15): 64-71.
- Ginn, Samantha L, Ian E Alexander, Michael L Edelstein, Mohammad R Abedi, et Jo Wixon. 2013. « Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2012 - an Update ». *The Journal of Gene Medicine* 15 (2) (février): 65-77. doi:10.1002/jgm.2698.

- Gonçalves, Manuel A F V. 2005. « Adeno-associated Virus: From Defective Virus to Effective Vector ». *Virology Journal* 2: 43. doi:10.1186/1743-422X-2-43.
- Gorman, L, D Suter, V Emerick, D Schümperli, et R Kole. 1998. « Stable Alteration of pre-mRNA Splicing Patterns by Modified U7 Small Nuclear RNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9) (avril 28): 4929-4934.
- Goyenvalle, Aurélie, Adeline Vulin, Françoise Fougerousse, France Leturcq, Jean-Claude Kaplan, Luis Garcia, et Olivier Danos. 2004. « Rescue of Dystrophic Muscle through U7 snRNA-mediated Exon Skipping ». *Science (New York, N.Y.)* 306 (5702) (décembre 3): 1796-1799. doi:10.1126/science.1104297.
- Gray, S J, S Nagabhushan Kalburgi, T J McCown, et R Jude Samulski. 2013. « Global CNS Gene Delivery and Evasion of anti-AAV-neutralizing Antibodies by Intrathecal AAV Administration in Non-human Primates ». *Gene Therapy* 20 (4) (avril): 450-459. doi:10.1038/gt.2012.101.
- Greelish, J P, L T Su, E B Lankford, J M Burkman, H Chen, S K Konig, I M Mercier, et al. 1999. « Stable Restoration of the Sarcoglycan Complex in Dystrophic Muscle Perfused with Histamine and a Recombinant Adeno-associated Viral Vector ». *Nature Medicine* 5 (4) (avril): 439-443. doi:10.1038/7439.
- Gregorevic, Paul, Michael J Blankinship, James M Allen, Robert W Crawford, Leonard Meuse, Daniel G Miller, David W Russell, et Jeffrey S Chamberlain. 2004. « Systemic Delivery of Genes to Striated Muscles Using Adeno-associated Viral Vectors ». *Nature Medicine* 10 (8) (août): 828-834. doi:10.1038/nm1085.
- Grimm, D, A Kern, K Rittner, et J A Kleinschmidt. 1998. « Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors ». *Human Gene Therapy* 9 (18) (décembre 10): 2745-2760. doi:10.1089/hum.1998.9.18-2745.
- Grimm, Dirk, Kusum Pandey, Hiroyuki Nakai, Theresa A Storm, et Mark A Kay. 2006. « Liver Transduction with Recombinant Adeno-associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype ». *Journal of Virology* 80 (1) (janvier): 426-439. doi:10.1128/JVI.80.1.426-439.2006.
- Groothuis, Tom A M, et Jacques Neefjes. 2005. « The Many Roads to Cross-presentation ». *The Journal of Experimental Medicine* 202 (10) (novembre 21): 1313-1318. doi:10.1084/jem.20051379.
- Grossman, Z, E Mendelson, F Brok-Simoni, F Mileguir, Y Leitner, G Rechavi, et B Ramot. 1992. « Detection of Adeno-associated Virus Type 2 in Human Peripheral Blood Cells ». *The Journal of General Virology* 73 ( Pt 4) (avril): 961-966.
- Hacein-Bey-Abina, Salima, Julia Hauer, Annick Lim, Capucine Picard, Gary P Wang, Charles C Berry, Chantal Martinache, et al. 2010. « Efficacy of Gene Therapy for X-linked Severe Combined Immunodeficiency ». *The New England Journal of Medicine* 363 (4) (juillet 22): 355-364. doi:10.1056/NEJMoa1000164.
- Halbert, C L, J M Allen, et A D Miller. 2001. « Adeno-associated Virus Type 6 (AAV6) Vectors Mediate Efficient Transduction of Airway Epithelial Cells in Mouse Lungs Compared to That of AAV2 Vectors ». *Journal of Virology* 75 (14) (juillet): 6615-6624. doi:10.1128/JVI.75.14.6615-6624.2001.
- Hartikka, J, L Sukhu, C Buchner, D Hazard, V Bozoukova, M Margalith, W K Nishioka, C J Wheeler, M Manthorp, et M Sawdey. 2001. « Electroporation-facilitated Delivery of Plasmid DNA in Skeletal Muscle: Plasmid Dependence of Muscle Damage and Effect of Poloxamer 188 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 4 (5) (novembre): 407-415. doi:10.1006/mthe.2001.0483.

- Haurigot, Virginia, Federico Mingozzi, George Buchlis, Daniel J Hui, Yifeng Chen, Etiena Basner-Tschakarjan, Valder R Arruda, et al. 2010. « Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (7) (juillet): 1318-1329. doi:10.1038/mt.2010.73.
- Hensley, Scott E, et Andrea Amalfitano. 2007. « Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (8) (août): 1417-1422. doi:10.1038/sj.mt.6300217.
- Hernandez, Y J, J Wang, W G Kearns, S Loiler, A Poirier, et T R Flotte. 1999. « Latent Adeno-associated Virus Infection Elicits Humoral but Not Cell-mediated Immune Responses in a Nonhuman Primate Model ». *Journal of Virology* 73 (10) (octobre): 8549-8558.
- Herson, Serge, Faycal Hentati, Aude Rigolet, Anthony Behin, Norma B Romero, France Leturcq, Pascal Laforêt, et al. 2012. « A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1- $\gamma$ -sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C ». *Brain: a journal of neurology* 135 (Pt 2) (février): 483-492. doi:10.1093/brain/awr342.
- Herzog, R W, J N Hagstrom, S H Kung, S J Tai, J M Wilson, K J Fisher, et K A High. 1997. « Stable Gene Transfer and Expression of Human Blood Coagulation Factor IX after Intramuscular Injection of Recombinant Adeno-associated Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (11) (mai 27): 5804-5809.
- Herzog, R W, J D Mount, V R Arruda, K A High, et C D Lothrop. 2001. « Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 4 (3) (septembre): 192-200. doi:10.1006/mthe.2001.0442.
- Herzog, R W, E Y Yang, L B Couto, J N Hagstrom, D Elwell, P A Fields, M Burton, et al. 1999. « Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector ». *Nature Medicine* 5 (1) (janvier): 56-63. doi:10.1038/4743.
- Herzog, Roland W. 2007. « Immune responses to AAV capsid: are mice not humans after all? ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (4) (avril): 649-650. doi:10.1038/sj.mt.6300123.
- Herzog, Roland W, Paul A Fields, Valder R Arruda, Jeff O Brubaker, Elina Armstrong, Darryl McClintock, Dwight A Bellinger, Linda B Couto, Timothy C Nichols, et Katherine A High. 2002. « Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy ». *Human Gene Therapy* 13 (11) (juillet 20): 1281-1291. doi:10.1089/104303402760128513.
- Hill, M, P Thebault, M Segovia, C Louvet, G Bériou, G Tilly, E Merieau, I Anegon, E Chiffolleau, et M-C Cuturi. 2011. « Cell Therapy with Autologous Tolerogenic Dendritic Cells Induces Allograft Tolerance through Interferon-gamma and Epstein-barr Virus-induced Gene 3 ». *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11 (10) (octobre): 2036-2045. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03651.x.
- Hirata, R K, et D W Russell. 2000. « Design and Packaging of Adeno-associated Virus Gene Targeting Vectors ». *Journal of Virology* 74 (10) (mai): 4612-4620.

- Hoffman, Brad E, Eric Dobrzynski, Lixin Wang, Lauren Hirao, Federico Mingozzi, Ou Cao, et Roland W Herzog. 2007. « Muscle as a target for supplementary factor IX gene transfer ». *Human Gene Therapy* 18 (7) (juillet): 603-613. doi:10.1089/hum.2007.042.
- Hori, Shohei, Takashi Nomura, et Shimon Sakaguchi. 2003. « Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3 ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5609) (février 14): 1057-1061. doi:10.1126/science.1079490.
- Hornung, Veit, Simon Rothenfusser, Stefanie Britsch, Anne Krug, Bernd Jahrsdörfer, Thomas Giese, Stefan Endres, et Gunther Hartmann. 2002. « Quantitative Expression of Toll-like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (9) (mai 1): 4531-4537.
- Hösel, Marianna, Mathias Broxtermann, Hanna Janicki, Knud Esser, Silke Arzberger, Pia Hartmann, Sonja Gillen, et al. 2011. « TLR2-mediated innate immune response in human non-parenchymal liver cells towards adeno-associated viral (AAV) vectors ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* (août 24). doi:10.1002/hep.24625. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21898480>.
- Hui, Daniel J, Etiena Basner-Tschakarjan, Yifeng Chen, Robert J Davidson, George Buchlis, Mustafa Yazicioglu, Gary C Pien, et al. 2013. « Modulation of CD8(+) T Cell Responses to AAV Vectors with IgG-derived MHC Class II Epitopes ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (9) (septembre). doi:10.1038/mt.2013.166.
- Hurlbut, Gregory D, Robin J Ziegler, Jennifer B Nietupski, Joseph W Foley, Lisa A Woodworth, Elizabeth Meyers, Scott D Bercury, et al. 2010. « Preexisting immunity and low expression in primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (11) (novembre): 1983-1994. doi:10.1038/mt.2010.175.
- Inagaki, Katsuya, Sally Fuess, Theresa A Storm, Gregory A Gibson, Charles F Mctiernan, Mark A Kay, et Hiroyuki Nakai. 2006. « Robust Systemic Transduction with AAV9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV8 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (1) (juillet): 45-53. doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.014.
- Jayandharan, Giridhara R, George Aslanidi, Ashley T Martino, Stephan C Jahn, George Q Perrin, Roland W Herzog, et Arun Srivastava. 2011. « Activation of the NF- $\kappa$ B pathway by adeno-associated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (9) (mars 1): 3743-3748. doi:10.1073/pnas.1012753108.
- Jiang, Haiyan, Linda B Couto, Susannah Patarroyo-White, Tongyao Liu, Dea Nagy, Joseph A Vargas, Shangzhen Zhou, et al. 2006. « Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy ». *Blood* 108 (10) (novembre 15): 3321-3328. doi:10.1182/blood-2006-04-017913.
- Johnson, Jarrod S, et R Jude Samulski. 2009. « Enhancement of Adeno-associated Virus Infection by Mobilizing Capsids into and Out of the Nucleolus ». *Journal of Virology* 83 (6) (mars): 2632-2644. doi:10.1128/JVI.02309-08.
- Jooss, K, Y Yang, K J Fisher, et J M Wilson. 1998. « Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers ». *Journal of Virology* 72 (5) (mai): 4212-23.

- Kaech, Susan M, E John Wherry, et Raft Ahmed. 2002. « Effector and Memory T-cell Differentiation: Implications for Vaccine Development ». *Nature Reviews. Immunology* 2 (4) (avril): 251-262. doi:10.1038/nri778.
- Kaludov, N, K E Brown, R W Walters, J Zabner, et J A Chiorini. 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 ». *Journal of Virology* 75 (15) (août): 6884-6893. doi:10.1128/JVI.75.15.6884-6893.2001.
- Kashiwakura, Yuji, Kenji Tamayose, Kazuhisa Iwabuchi, Yukihiko Hirai, Takashi Shimada, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Masami Watanabe, Kazuo Oshimi, et Hiroyuki Daida. 2005. « Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Coreceptor for Adeno-associated Virus Type 2 Infection ». *Journal of Virology* 79 (1) (janvier): 609-614. doi:10.1128/JVI.79.1.609-614.2005.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2006. « Innate immune recognition of viral infection ». *Nature Immunology* 7 (2) (février): 131-137. doi:10.1038/ni1303.
- Kay, M A, C S Manno, M V Ragni, P J Larson, L B Couto, A McClelland, B Glader, et al. 2000. « Evidence for Gene Transfer and Expression of Factor IX in Haemophilia B Patients Treated with an AAV Vector ». *Nature Genetics* 24 (3) (mars): 257-261. doi:10.1038/73464.
- Kelly, Meagan E, Jiakai Zhuo, Arpita S Bharadwaj, et Hengjun Chao. 2009. « Induction of Immune Tolerance to FIX Following Muscular AAV Gene Transfer Is AAV-dose/FIX-level Dependent ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (février 24). doi:10.1038/mt.2009.25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/19240690>.
- Kessler, P D, G M Podsakoff, X Chen, S A McQuiston, P C Colosi, L A Matelis, G J Kurtzman, et B J Byrne. 1996. « Gene Delivery to Skeletal Muscle Results in Sustained Expression and Systemic Delivery of a Therapeutic Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24) (novembre 26): 14082-14087.
- Ketloy, Chutitorn, Anneke Engering, Utaiwan Srichairatanakul, Amporn Limsalakpetch, Kosol Yongvanitchit, Sathit Pichyangkul, et Kiat Ruxrungtham. 2008. « Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates ». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125 (1-2) (septembre 15): 18-30. doi:10.1016/j.vetimm.2008.05.001.
- Kigerl, Kristina A, John C Gensel, Daniel P Ankeny, Jessica K Alexander, Dustin J Donnelly, et Phillip G Popovich. 2009. « Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing Either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (43) (octobre 28): 13435-13444. doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009.
- Klein, R M, E D Wolf, R Wu, et J C Sanford. 1992. « High-velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids into Living Cells. 1987 ». *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 384-386.
- Klein, Ronald L, Robert D Dayton, Jason B Tatom, Cynthia G Diaczynsky, et Michael F Salvatore. 2008. « Tau Expression Levels from Various Adeno-associated Virus Vector Serotypes Produce Graded Neurodegenerative Disease States ». *The European Journal of Neuroscience* 27 (7) (avril): 1615-1625. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06161.x.

- Kotin, R M, R M Linden, et K I Berns. 1992. « Characterization of a Preferred Site on Human Chromosome 19q for Integration of Adeno-associated Virus DNA by Non-homologous Recombination ». *The EMBO Journal* 11 (13) (décembre): 5071-5078.
- Kratlian, Razmig Garo, et Roger J Hajjar. 2012. « Cardiac Gene Therapy: From Concept to Reality ». *Current Heart Failure Reports* 9 (1) (mars): 33-39. doi:10.1007/s11897-011-0077-1.
- Kung, S H, J N Hagstrom, D Cass, S J Tai, H F Lin, D W Stafford, et K A High. 1998. « Human Factor IX Corrects the Bleeding Diathesis of Mice with Hemophilia B ». *Blood* 91 (3) (février 1): 784-790.
- Larosa, David F, et Jordan S Orange. 2008. « 1. Lymphocytes ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (2 Suppl) (février): S364-369; quiz S412. doi:10.1016/j.jaci.2007.06.016.
- Larsen, C P, S C Ritchie, T C Pearson, P S Linsley, et R P Lowry. 1992. « Functional Expression of the Costimulatory Molecule, B7/BB1, on Murine Dendritic Cell Populations ». *The Journal of Experimental Medicine* 176 (4) (octobre 1): 1215-1220.
- Latz, Eicke, Annett Schoenemeyer, Alberto Visintin, Katherine A Fitzgerald, Brian G Monks, Cathrine F Knetter, Egil Lien, Nadra J Nilsen, Terje Espevik, et Douglas T Golenbock. 2004. « TLR9 Signals after Translocating from the ER to CpG DNA in the Lysosome ». *Nature Immunology* 5 (2) (février): 190-198. doi:10.1038/ni1028.
- Lebherz, Corinna, Albert Maguire, Waixing Tang, Jean Bennett, et James M Wilson. 2008. « Novel AAV Serotypes for Improved Ocular Gene Transfer ». *The Journal of Gene Medicine* 10 (4) (avril): 375-382. doi:10.1002/jgm.1126.
- Li, Chengwen, Yi He, Sarah Nicolson, Matt Hirsch, Marc S Weinberg, Ping Zhang, Tal Kafri, et R Jude Samulski. 2013. « Adeno-associated Virus Capsid Antigen Presentation Is Dependent on Endosomal Escape ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3) (mars 1): 1390-1401. doi:10.1172/JCI66611.
- Li, Hojun, Virginia Haurigot, Yannick Doyon, Tianjian Li, Sunnie Y Wong, Anand S Bhagwat, Nirav Malani, et al. 2011. « In Vivo Genome Editing Restores Haemostasis in a Mouse Model of Haemophilia ». *Nature* 475 (7355) (juillet 14): 217-221. doi:10.1038/nature10177.
- Li, Hua, Marcio O Lasaro, Bei Jia, Shih Wen Lin, Larissa H Haut, Katherine A High, et Hildegund Cj Ertl. 2011b. « Capsid-specific T-cell Responses to Natural Infections With Adeno-associated Viruses in Humans Differ From Those of Nonhuman Primates ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (mai 17). doi:10.1038/mt.2011.81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21587208>.
- Li, Hua, Samuel L Murphy, Wynetta Giles-Davis, Shyrie Edmonson, Zhiquan Xiang, Yan Li, Marcio O Lasaro, Katherine A High, et Hildegund Cj Ertl. 2007. « Pre-existing AAV capsid-specific CD8+ T cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (4) (avril): 792-800. doi:10.1038/sj.mt.6300090.
- Li, Hua, Steven Tuyishime, Te-Lang Wu, Wynetta Giles-Davis, Dongming Zhou, Weidong Xiao, Katherine A High, et Hildegund Cj Ertl. 2011a. « Adeno-associated Virus Vectors Serotype 2 Induce Prolonged Proliferation of Capsid-Specific CD8(+) T Cells in Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (3) (mars): 536-546. doi:10.1038/mt.2010.267.
- Lock, Martin, Susan McGorray, Alberto Auricchio, Eduard Ayuso, E Jeffrey Beecham, Véronique Blouin-Tavel, Fatima Bosch, et al. 2010. « Characterization of a

- Recombinant Adeno-associated Virus Type 2 Reference Standard Material ». *Human Gene Therapy* 21 (10) (octobre): 1273-1285. doi:10.1089/hum.2009.223.
- Lotery, Andrew J, Grace S Yang, Robert F Mullins, Stephen R Russell, Michael Schmidt, Edwin M Stone, Jonathan D Lindbloom, John A Chiorini, Robert M Kotin, et Beverly L Davidson. 2003. « Adeno-associated Virus Type 5: Transduction Efficiency and Cell-type Specificity in the Primate Retina ». *Human Gene Therapy* 14 (17) (novembre 20): 1663-1671. doi:10.1089/104303403322542301.
- Louboutin, Jean-Pierre, Lili Wang, et James M Wilson. 2005. « Gene Transfer into Skeletal Muscle Using Novel AAV Serotypes ». *The Journal of Gene Medicine* 7 (4) (avril): 442-451. doi:10.1002/jgm.686.
- Lu, Yuanqing, Young-Kook Choi, Martha Campbell-Thompson, Chengwen Li, Qiushi Tang, James M Crawford, Terence R Flotte, et Sihong Song. 2006. « Therapeutic Level of Functional Human Alpha 1 Antitrypsin (hAAT) Secreted from Murine Muscle Transduced by Adeno-associated Virus (rAAV1) Vector ». *The Journal of Gene Medicine* 8 (6) (juin): 730-735. doi:10.1002/jgm.896.
- Lu, Yuanqing, et Sihong Song. 2009. « Distinct Immune Responses to Transgene Products from rAAV1 and rAAV8 Vectors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (40) (juin 10): 17158-17162. doi:10.1073/pnas.0909520106.
- Lusby, E, K H Fife, et K I Berns. 1980. « Nucleotide Sequence of the Inverted Terminal Repetition in Adeno-associated Virus DNA ». *Journal of Virology* 34 (2) (mai): 402-409.
- Madsen, Declan, Emma R Cantwell, Timothy O'Brien, Patricia A Johnson, et Bernard P Mahon. 2009. « Adeno-associated Virus Serotype 2 Induces Cell-mediated Immune Responses Directed Against Multiple Epitopes of the Capsid Protein VP1 ». *The Journal of General Virology* 90 (Pt 11) (novembre): 2622-2633. doi:10.1099/vir.0.014175-0.
- Majowicz, Anna, Piotr Maczuga, Karin L Kwikkers, Sander van der Marel, Richard van Logtenstein, Harald Petry, Sander J van Deventer, Pavlina Konstantinova, et Valerie Ferreira. 2013. « Mir-142-3p Target Sequences Reduce Transgene Directed Immunogenicity Following Intramuscular AAV1 Vector-mediated Gene Delivery ». *The Journal of Gene Medicine* (mai 8). doi:10.1002/jgm.2712.
- Manno, Catherine S, Amy J Chew, Sylvia Hutchison, Peter J Larson, Roland W Herzog, Valder R Arruda, Shing Jen Tai, et al. 2003. « AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B ». *Blood* 101 (8) (avril 15): 2963-2972. doi:10.1182/blood-2002-10-3296.
- Manno, Catherine S, Glenn F Pierce, Valder R Arruda, Bertil Glader, Margaret Ragni, John J Rasko, John Rasko, et al. 2006. « Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response ». *Nature Medicine* 12 (3) (mars): 342-347. doi:10.1038/nm1358.
- Martino, Ashley T, Etiena Basner-Tschakarjan, David M Markusic, Jonathan D Finn, Christian Hinderer, Shangzhen Zhou, David A Ostrov, et al. 2013. « Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells ». *Blood* (janvier 16). doi:10.1182/blood-2012-10-460733.
- Martino, Ashley T, Masataka Suzuki, David M Markusic, Irene Zolotukhin, Renee C Ryals, Babak Moghimi, Hildegund C J Ertl, Daniel A Muruve, Brendan Lee, et Roland W Herzog. 2011. « The genome of self-complementary AAV vectors increases TLR9-dependent innate immune responses in the liver ». *Blood* (avril 7). doi:10.1182/blood-2010-10-314518. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474674>.

- Mays, Lauren E, Luk H Vandenberghe, Ru Xiao, Peter Bell, Hyun-Joo Nam, Mavis Agbandje-McKenna, et James M Wilson. 2009. « Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (10) (mai 15): 6051-6060. doi:10.4049/jimmunol.0803965.
- Mays, Lauren E, Lili Wang, Jianping Lin, Peter Bell, Alison Crawford, E John Wherry, et James M Wilson. 2013. « AAV8 Induces Tolerance in Murine Muscle as a Result of Poor APC Transduction, T Cell Exhaustion and Minimal MHCI Upregulation on Target Cells ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (juin 19). doi:10.1038/mt.2013.134.
- Mays, Lauren E, et James M Wilson. 2011. « The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (1) (janvier): 16-27. doi:10.1038/mt.2010.250.
- McCarty, D M, H Fu, P E Monahan, C E Toulson, P Naik, et R J Samulski. 2003. « Adeno-associated Virus Terminal Repeat (TR) Mutant Generates Self-complementary Vectors to Overcome the Rate-limiting Step to Transduction in Vivo ». *Gene Therapy* 10 (26) (décembre): 2112-2118. doi:10.1038/sj.gt.3302134.
- McCarty, D M, P E Monahan, et R J Samulski. 2001. « Self-complementary Recombinant Adeno-associated Virus (scAAV) Vectors Promote Efficient Transduction Independently of DNA Synthesis ». *Gene Therapy* 8 (16) (août): 1248-1254. doi:10.1038/sj.gt.3301514.
- McCarty, Douglas M. 2008. « Self-complementary AAV vectors; advances and applications ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (10) (octobre): 1648-56. doi:10.1038/mt.2008.171.
- McIntosh, J H, M Cochrane, S Cobbold, H Waldmann, S A Nathwani, A M Davidoff, et A C Nathwani. 2011. « Successful attenuation of humoral immunity to viral capsid and transgenic protein following AAV-mediated gene transfer with a non-depleting CD4 antibody and cyclosporine ». *Gene Therapy* (juin 30). doi:10.1038/gt.2011.64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716299>.
- Mendell, Jerry R, Katherine Campbell, Louise Rodino-Klapac, Zarife Sahenk, Chris Shilling, Sarah Lewis, Dawn Bowles, et al. 2010a. « Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy ». *The New England Journal of Medicine* 363 (15) (octobre 7): 1429-1437. doi:10.1056/NEJMoa1000228.
- Mendell, Jerry R, Louise R Rodino-Klapac, Xiomara Q Rosales, Brian D Coley, Gloria Galloway, Sarah Lewis, Vinod Malik, et al. 2010b. « Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D ». *Annals of Neurology* 68 (5) (novembre): 629-638. doi:10.1002/ana.22251.
- Miao, C H, R O Snyder, D B Schowalter, G A Patijn, B Donahue, B Winther, et M A Kay. 1998. « The Kinetics of rAAV Integration in the Liver ». *Nature Genetics* 19 (1) (mai): 13-15. doi:10.1038/ng0598-13.
- Migueles, Stephen A, Alisha C Laborico, W Lesley Shupert, M Shirin Sabbaghian, Ronald Rabin, Claire W Hallahan, Debbie Van Baarle, et al. 2002. « HIV-specific CD8+ T Cell Proliferation Is Coupled to Perforin Expression and Is Maintained in Nonprogressors ». *Nature Immunology* 3 (11) (novembre): 1061-1068. doi:10.1038/ni845.
- Mingozzi, Federico, Yifeng Chen, Samuel L Murphy, Shyrie C Edmonson, Alex Tai, Sandra D Price, Mark E Metzger, et al. 2012. « Pharmacological Modulation of Humoral Immunity in a Nonhuman Primate Model of AAV Gene Transfer for Hemophilia B ».

- Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (mai 8). doi:10.1038/mt.2012.84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565846>.
- Mingozzi, Federico, Nicole C Hasbrouck, Etiena Basner-Tschakarjan, Shyrie A Edmonson, Daniel J Hui, Denise E Sabatino, Shangzhen Zhou, et al. 2007b. « Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver ». *Blood* 110 (7) (octobre 1): 2334-2341. doi:10.1182/blood-2007-03-080093.
- Mingozzi, Federico, et Katherine A High. 2007. « Immune responses to AAV in clinical trials ». *Current Gene Therapy* 7 (5) (octobre): 316-24.
- Mingozzi, Federico, Yi-Lin Liu, Eric Dobrzynski, Antje Kaufhold, Jian Hua Liu, YuQin Wang, Valder R Arruda, Katherine A High, et Roland W Herzog. 2003. « Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9) (mai): 1347-1356. doi:10.1172/JCI16887.
- Mingozzi, Federico, Marcela V Maus, Daniel J Hui, Denise E Sabatino, Samuel L Murphy, John E J Rasko, Margaret V Ragni, et al. 2007a. « CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans ». *Nature Medicine* 13 (4) (avril): 419-422. doi:10.1038/nm1549.
- Mingozzi, Federico, Janneke J Meulenberg, Daniel J Hui, Etiena Basner-Tschakarjan, Nicole C Hasbrouck, Shyrie A Edmonson, Natalie A Hutnick, et al. 2009. « AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells ». *Blood* 114 (10) (septembre 3): 2077-2086. doi:10.1182/blood-2008-07-167510.
- Miyazaki, Jun-ichi, et Hiroyuki Aihara. 2002. « Gene Transfer into Muscle by Electroporation in Vivo ». *Methods in Molecular Medicine* 69: 49-62.
- Miyoshi, H, M Takahashi, F H Gage, et I M Verma. 1997. « Stable and Efficient Gene Transfer into the Retina Using an HIV-based Lentiviral Vector ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19) (septembre 16): 10319-10323.
- Monteilhet, Virginie, Samir Saheb, Sylvie Boutin, Christian Leborgne, Philippe Veron, Marie-Françoise Montus, Philippe Moullier, Olivier Benveniste, et Carole Masurier. 2011. « A 10 Patient Case Report on the Impact of Plasmapheresis Upon Neutralizing Factors Against Adeno-associated Virus (AAV) Types 1, 2, 6, and 8 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (mai 31). doi:10.1038/mt.2011.108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629225>.
- Moodie, Z, L Price, C Gouttefangeas, A Mander, S Janetzki, M Löwer, M J P Welters, C Ottensmeier, S H van der Burg, et Cedrik M Britten. 2010. « Response Definition Criteria for ELISPOT Assays Revisited ». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 59 (10) (octobre): 1489-1501. doi:10.1007/s00262-010-0875-4.
- Moreau, Aurélie, Rita Vicente, Laurence Dubreil, Oumeya Adjali, Guillaume Podevin, Chantal Jacquet, Jack Yves Deschamps, et al. 2009. « Efficient Intrathymic Gene Transfer Following in Situ Administration of a rAAV Serotype 8 Vector in Mice and Nonhuman Primates ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (3) (mars): 472-479. doi:10.1038/mt.2008.272.
- Moskalenko, M, L Chen, M van Roey, B A Donahue, R O Snyder, J G McArthur, et S D Patel. 2000. « Epitope Mapping of Human Anti-adeno-associated Virus Type 2 Neutralizing

Antibodies: Implications for Gene Therapy and Virus Structure ». *Journal of Virology* 74 (4) (février): 1761-1766.

- Moullier, Philippe, et Richard O Snyder. 2008. « International Efforts for Recombinant Adeno-associated Viral Vector Reference Standards ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (7) (juillet): 1185-1188. doi:10.1038/mt.2008.125.
- . 2012. « Recombinant Adeno-associated Viral Vector Reference Standards ». *Methods in Enzymology* 507: 297-311. doi:10.1016/B978-0-12-386509-0.00015-6.
- Mount, Jane D, Roland W Herzog, D Michael Tillson, Susan A Goodman, Nancy Robinson, Mark L McClelland, Dwight Bellinger, et al. 2002. « Sustained Phenotypic Correction of Hemophilia B Dogs with a Factor IX Null Mutation by Liver-directed Gene Therapy ». *Blood* 99 (8) (avril 15): 2670-2676.
- Mueller, Christian, Jeffrey D Chulay, Bruce C Trapnell, Margaret Humphries, Brenna Carey, Robert A Sandhaus, Noel G McElvaney, et al. 2013. « Human Treg Responses Allow Sustained Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Transgene Expression ». *The Journal of Clinical Investigation* (novembre 15). doi:10.1172/JCI70314.
- Murphy, Samuel L, Hojun Li, Federico Mingozzi, Denise E Sabatino, Daniel J Hui, Shyrie A Edmonson, et Katherine A High. 2009. « Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration ». *Journal of Medical Virology* 81 (1) (janvier): 65-74. doi:10.1002/jmv.21360.
- Nakai, H, T A Storm, et M A Kay. 2000a. « Increasing the Size of rAAV-mediated Expression Cassettes in Vivo by Intermolecular Joining of Two Complementary Vectors ». *Nature Biotechnology* 18 (5) (mai): 527-532. doi:10.1038/75390.
- . 2000b. « Recruitment of Single-stranded Recombinant Adeno-associated Virus Vector Genomes and Intermolecular Recombination Are Responsible for Stable Transduction of Liver in Vivo ». *Journal of Virology* 74 (20) (octobre): 9451-9463.
- Nakai, H, S R Yant, T A Storm, S Fuess, L Meuse, et M A Kay. 2001. « Extrachromosomal Recombinant Adeno-associated Virus Vector Genomes Are Primarily Responsible for Stable Liver Transduction in Vivo ». *Journal of Virology* 75 (15) (août): 6969-6976. doi:10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001.
- Nam, Hyun-Joo, Brittney L Gurda, Robert McKenna, Mark Potter, Barry Byrne, Maxim Salganik, Nicholas Muzyczka, et Mavis Agbandje-McKenna. 2011. « Structural studies of AAV8 capsid transitions associated with endosomal trafficking ». *Journal of Virology* (septembre 7). doi:10.1128/JVI.05305-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900159>.
- Nathwani, Amit C, John T Gray, Jenny McIntosh, Catherine Y C Ng, Junfang Zhou, Yunyu Spence, Melanie Cochrane, Elaine Gray, Edward G D Tuddenham, et Andrew M Davidoff. 2007. « Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates ». *Blood* 109 (4) (février 15): 1414-1421. doi:10.1182/blood-2006-03-010181.
- Nathwani, Amit C, John T Gray, Catherine Y C Ng, Junfang Zhou, Yunyu Spence, Simon N Waddington, Edward G D Tuddenham, 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 (7) (avril 1): 2653-2661. doi:10.1182/blood-2005-10-4035.

- Nathwani, Amit C, Cecilia Rosales, Jenny McIntosh, Ghasem Rastegarlar, Devhrut Nathwani, Deepak Raj, Sushmita Nawathe, et al. 2011. « Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (janvier 18). doi:10.1038/mt.2010.274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245849>.
- Nathwani, Amit C, Edward G D Tuddenham, Savita Rangarajan, Cecilia Rosales, Jenny McIntosh, David C Linch, Pratima Chowdary, et al. 2011. « Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B ». *The New England Journal of Medicine* (décembre 10). doi:10.1056/NEJMoa1108046. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149959>.
- Ni, W, C Le Guiner, G Gernoux, M Penaud-Budloo, P Moullier, et R O Snyder. 2011. « Longevity of rAAV vector and plasmid DNA in blood after intramuscular injection in nonhuman primates: implications for gene doping ». *Gene Therapy* 18 (7) (juillet): 709-718. doi:10.1038/gt.2011.19.
- Nonnenmacher, M, et T Weber. 2012. « Intracellular Transport of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors ». *Gene Therapy* 19 (6) (juin): 649-658. doi:10.1038/gt.2012.6.
- Nonnenmacher, Mathieu, et Thomas Weber. 2011. « Adeno-associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway ». *Cell Host & Microbe* 10 (6) (décembre 15): 563-576. doi:10.1016/j.chom.2011.10.014.
- Nowrouzi, Ali, Magalie Penaud-Budloo, Christine Kaepfel, Uwe Appelt, Caroline Le Guiner, Philippe Moullier, Christof von Kalle, Richard O Snyder, et Manfred Schmidt. 2012. « Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (6) (juin): 1177-1186. doi:10.1038/mt.2012.47.
- Ogston, P, K Raj, et P Beard. 2000. « Productive Replication of Adeno-associated Virus Can Occur in Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Episome-containing Keratinocytes and Is Augmented by the HPV-16 E2 Protein ». *Journal of Virology* 74 (8) (avril): 3494-3504.
- Ohshima, Sachiko, Jin-Hong Shin, Katsutoshi Yuasa, Akiyo Nishiyama, Junichi Kira, Takashi Okada, et Shin'ichi Takeda. 2009. « Transduction Efficiency and Immune Response Associated with the Administration of AAV8 Vector into Dog Skeletal Muscle ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (1) (janvier): 73-80. doi:10.1038/mt.2008.225.
- Okada, Ryo, Takaaki Kondo, Fumichika Matsuki, Hiroshi Takata, et Masafumi Takiguchi. 2008. « Phenotypic Classification of Human CD4+ T Cell Subsets and Their Differentiation ». *International Immunology* 20 (9) (septembre): 1189-1199. doi:10.1093/intimm/dxn075.
- Pacak, Christina A, Yoshihisa Sakai, Bijoy D Thattaliyath, Cathryn S Mah, et Barry J Byrne. 2008. « Tissue Specific Promoters Improve Specificity of AAV9 Mediated Transgene Expression Following Intra-vascular Gene Delivery in Neonatal Mice ». *Genetic Vaccines and Therapy* 6: 13. doi:10.1186/1479-0556-6-13.
- Papadea, C, et I J Check. 1989. « Human Immunoglobulin G and Immunoglobulin G Subclasses: Biochemical, Genetic, and Clinical Aspects ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 27 (1): 27-58. doi:10.3109/10408368909106589.
- Parzych, Elizabeth M, Hua Li, Xiangfan Yin, Qin Liu, Te-Lang Wu, Gregory M Podsakoff, Katherine A High, Matthew H Levine, et Hildegund C J Ertl. 2013. « Effects of Immunosuppression on Circulating Adeno-Associated Virus Capsid-Specific T Cells

- in Humans ». *Human Gene Therapy* 24 (4) (avril): 431-442. doi:10.1089/hum.2012.246.
- Passini, Marco A, Jie Bu, Amy M Richards, Cathrine Kinnecom, S Pablo Sardi, Lisa M Stanek, Yimin Hua, et al. 2011. « Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy ». *Science Translational Medicine* 3 (72) (mars 2): 72ra18. doi:10.1126/scitranslmed.3001777.
- Pedersen, Bente Klarlund. 2011. « Muscles and Their Myokines ». *The Journal of Experimental Biology* 214 (Pt 2) (janvier 15): 337-346. doi:10.1242/jeb.048074.
- Penaud-Budloo, Magalie, Caroline Le Guiner, Ali Nowrouzi, Alice Toromanoff, Yan Chérel, Pierre Chenuaud, Manfred Schmidt, et al. 2008. « Adeno-associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle ». *Journal of Virology* 82 (16) (août): 7875-7885. doi:10.1128/JVI.00649-08.
- Pereira, D J, D M McCarty, et N Muzyczka. 1997. « The Adeno-associated Virus (AAV) Rep Protein Acts as Both a Repressor and an Activator to Regulate AAV Transcription During a Productive Infection ». *Journal of Virology* 71 (2) (février): 1079-1088.
- Petit, Lolita, Elsa Lhérieau, Michel Weber, Guylène Le Meur, Jack-Yves Deschamps, Nathalie Provost, Alexandra Mendes-Madeira, et al. 2012. « Restoration of Vision in the pde6 $\beta$ -deficient Dog, a Large Animal Model of Rod-cone Dystrophy ». *Molecular Therapy* 20 (11) (juillet 24): 2019-2030. doi:10.1038/mt.2012.134.
- Pien, Gary C, Etiena Basner-Tschakarjan, Daniel J Hui, Ashley N Mentlik, Jonathan D Finn, Nicole C Hasbrouck, Shangzhen Zhou, et al. 2009. « Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6) (juin): 1688-1695. doi:10.1172/JCI36891.
- Poirier, Nicolas, Agnes M Azimzadeh, Tianshu Zhang, Nahzli Dilek, Caroline Mary, Bao Nguyen, Xavier Tillou, et al. 2010. « Inducing CTLA-4-dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation ». *Science Translational Medicine* 2 (17) (février 3): 17ra10. doi:10.1126/scitranslmed.3000116.
- Power, U F, T Huss, V Michaud, H Plotnicky-Gilquin, J Y Bonnefoy, et T N Nguyen. 2001. « Differential Histopathology and Chemokine Gene Expression in Lung Tissues Following Respiratory Syncytial Virus (RSV) Challenge of Formalin-inactivated RSV- or BBG2Na-immunized Mice ». *Journal of Virology* 75 (24) (décembre): 12421-12430. doi:10.1128/JVI.75.24.12421-12430.2001.
- Qiao, Chunping, Juan Li, Hui Zheng, Janet Bogan, Jianbin Li, Zhenhua Yuan, Cheng Zhang, Dan Bogan, Joe Kornegay, et Xiao Xiao. 2009. « Hydrodynamic Limb Vein Injection of Adeno-associated Virus Serotype 8 Vector Carrying Canine Myostatin Propeptide Gene into Normal Dogs Enhances Muscle Growth ». *Human Gene Therapy* 20 (1) (janvier): 1-10. doi:10.1089/hum.2008.135.
- Qing, K, C Mah, J Hansen, S Zhou, V Dwarki, et A Srivastava. 1999. « Human Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Is a Co-receptor for Infection by Adeno-associated Virus 2 ». *Nature Medicine* 5 (1) (janvier): 71-77. doi:10.1038/4758.
- Raake, Philip W J, Philipp Schlegel, Jan Ksienzyk, Julia Reinkober, Jens Barthelmes, Stefanie Schinkel, Sven Pleger, et al. 2013. « AAV6. $\beta$ ARKct Cardiac Gene Therapy Ameliorates Cardiac Function and Normalizes the Catecholaminergic Axis in a Clinically Relevant Large Animal Heart Failure Model ». *European Heart Journal* 34 (19) (mai): 1437-1447. doi:10.1093/eurheartj/ehr447.

- Ramsdell, Fred. 2003. « Foxp3 and Natural Regulatory T Cells: Key to a Cell Lineage? » *Immunity* 19 (2) (août): 165-168.
- Rodino-Klapac, L R, J-S Lee, R C Mulligan, K R Clark, et J R Mendell. 2008. « Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D ». *Neurology* 71 (4) (juillet 22): 240-247. doi:10.1212/01.wnl.0000306309.85301.e2.
- Romano, Gaetano. 2007. « Current Development of Nonviral-mediated Gene Transfer ». *Drug News & Perspectives* 20 (4) (mai): 227-231. doi:10.1358/dnp.2007.20.4.1103528.
- Rose, J A, K I Berns, M D Hoggan, et F J Kocot. 1969. « Evidence for a Single-stranded Adenovirus-associated Virus Genome: Formation of a DNA Density Hybrid on Release of Viral DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 64 (3) (novembre): 863-869.
- Ross, Colin J D, Jaap Twisk, Andrew C Bakker, Fudan Miao, Dennis Verbart, Jaap Rip, Tamara Godbey, et al. 2006. « Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation ». *Human Gene Therapy* 17 (5) (mai): 487-499. doi:10.1089/hum.2006.17.487.
- Ross, Colin J D, Jaap Twisk, Janneke M Meulenberg, Guoqing Liu, Karin van den Oever, Ewoud Moraal, Wim T Hermens, et al. 2004. « Long-term Correction of Murine Lipoprotein Lipase Deficiency with AAV1-mediated Gene Transfer of the Naturally Occurring LPL(S447X) Beneficial Mutation ». *Human Gene Therapy* 15 (9) (septembre): 906-919. doi:10.1089/hum.2004.15.906.
- Rutledge, E A, C L Halbert, et D W Russell. 1998. « Infectious Clones and Vectors Derived from Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Other Than AAV Type 2 ». *Journal of Virology* 72 (1) (janvier): 309-319.
- Salmon, P, V Kindler, O Ducrey, B Chapuis, R H Zubler, et D Trono. 2000. « High-level Transgene Expression in Human Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Lineages after Transduction with Improved Lentiviral Vectors ». *Blood* 96 (10) (novembre 15): 3392-3398.
- Salvetti, A, S Orève, G Chadeuf, D Favre, Y Cherel, P Champion-Arnaud, J David-Ameline, et P Moullier. 1998. « Factors Influencing Recombinant Adeno-associated Virus Production ». *Human Gene Therapy* 9 (5) (mars 20): 695-706. doi:10.1089/hum.1998.9.5-695.
- Samaranch, Lluís, Ernesto A Salegio, Waldy San Sebastian, Adrian P Kells, Kevin D Foust, John R Bringas, Clementine Lamarre, John Forsayeth, Brian K Kaspar, et Krystof S Bankiewicz. 2012. « Adeno-associated Virus Serotype 9 Transduction in the Central Nervous System of Nonhuman Primates ». *Human Gene Therapy* 23 (4) (avril): 382-389. doi:10.1089/hum.2011.200.
- Sawitzki, Birgit, Cherry I Kingsley, Vanessa Oliveira, Mahzuz Karim, Manuela Herber, et Kathryn J Wood. 2005. « IFN-gamma Production by Alloantigen-reactive Regulatory T Cells Is Important for Their Regulatory Function in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 201 (12) (juin 20): 1925-1935. doi:10.1084/jem.20050419.
- Scallan, Ciaran D, Haiyan Jiang, Tongyao Liu, Susannah Patarroyo-White, Jurg M Sommer, Shangzhen Zhou, Linda B Couto, et Glenn F Pierce. 2006. « Human Immunoglobulin Inhibits Liver Transduction by AAV Vectors at Low AAV2 Neutralizing Titers in SCID Mice ». *Blood* 107 (5) (mars 1): 1810-1817. doi:10.1182/blood-2005-08-3229.

- Schlehofer, J R, M Ehrbar, et H zur Hausen. 1986. « Vaccinia Virus, Herpes Simplex Virus, and Carcinogens Induce DNA Amplification in a Human Cell Line and Support Replication of a Helpervirus Dependent Parvovirus ». *Virology* 152 (1) (juillet 15): 110-117.
- Schnepf, Bruce C, K Reed Clark, Dori L Klemanski, Christina A Pacak, et Philip R Johnson. 2003. « Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle ». *Journal of Virology* 77 (6) (mars): 3495-504.
- Schroeder, Harry W, Jr, et Lisa Cavacini. 2010. « Structure and Function of Immunoglobulins ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2) (février): S41-52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Shen, Shen, Kelli D Bryant, Sarah M Brown, Scott H Randell, et Aravind Asokan. 2011. « Terminal N-linked Galactose Is the Primary Receptor for Adeno-associated Virus 9 ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (15) (avril 15): 13532-13540. doi:10.1074/jbc.M110.210922.
- Shen, Shen, Kelli D Bryant, Junjiang Sun, Sarah M Brown, Andrew Troupes, Nagesh Pulicherla, et Aravind Asokan. 2012. « Glycan Binding Avidity Determines the Systemic Fate of Adeno-associated Virus Type 9 ». *Journal of Virology* 86 (19) (octobre): 10408-10417. doi:10.1128/JVI.01155-12.
- Simonelli, Francesca, Albert M Maguire, Francesco Testa, Eric A Pierce, Federico Mingozzi, Jeannette L Bennicelli, Settimio Rossi, et al. 2010. « Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis Is Safe and Effective through 1.5 Years after Vector Administration ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3) (mars): 643-650. doi:10.1038/mt.2009.277.
- Skelton, D, N Satake, et D B Kohn. 2001. « The Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) Is Minimally Immunogenic in C57BL/6 Mice ». *Gene Therapy* 8 (23) (décembre): 1813-1814. doi:10.1038/sj.gt.3301586.
- Smith, R H, et R M Kotin. 1998. « The Rep52 Gene Product of Adeno-associated Virus Is a DNA Helicase with 3'-to-5' Polarity ». *Journal of Virology* 72 (6) (juin): 4874-4881.
- Snyder, R O, C Miao, L Meuse, J Tubb, B A Donahue, H F Lin, D W Stafford, et al. 1999. « Correction of Hemophilia B in Canine and Murine Models Using Recombinant Adeno-associated Viral Vectors ». *Nature Medicine* 5 (1) (janvier): 64-70. doi:10.1038/4751.
- Snyder, R O, S K Spratt, C Lagarde, D Bohl, B Kaspar, B Sloan, L K Cohen, et O Danos. 1997. « Efficient and Stable Adeno-associated Virus-mediated Transduction in the Skeletal Muscle of Adult Immunocompetent Mice ». *Human Gene Therapy* 8 (16) (novembre 1): 1891-1900. doi:10.1089/hum.1997.8.16-1891.
- Song, S, P J Laipis, K I Berns, et T R Flotte. 2001. « Effect of DNA-dependent Protein Kinase on the Molecular Fate of the rAAV2 Genome in Skeletal Muscle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7) (mars 27): 4084-4088. doi:10.1073/pnas.061014598.
- Song, S, M Morgan, T Ellis, A Poirier, K Chesnut, J Wang, M Brantly, et al. 1998. « Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24) (novembre 24): 14384-14388.
- Sonntag, Florian, Svenja Bleker, Barbara Leuchs, Roger Fischer, et Jürgen A Kleinschmidt. 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 ». *Journal of Virology* 80 (22) (novembre): 11040-11054. doi:10.1128/JVI.01056-06.
- Stieger, Knut, Josef Schroeder, Nathalie Provost, Alexandra Mendes-Madeira, Brahim Belbellaa, Guylène Le Meur, Michel Weber, et al. 2009. « Detection of Intact rAAV Particles up to 6 Years after Successful Gene Transfer in the Retina of Dogs and Primates ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (3) (mars): 516-523. doi:10.1038/mt.2008.283.
- Stout, Robert D, Chuancang Jiang, Bharati Matta, Illya Tietzel, Stephanie K Watkins, et Jill Suttles. 2005. « Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (1) (juillet 1): 342-349.
- Stroes, Erik S, Katherine A High, Federico Mingozzi, Janneke J Meulenberg, Daniel J Hui, Etiena Basner-Tschakarjan, Nicole C Hasbrouck, et al. 2009. « AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells ». *Blood* (juin 8). doi:10.1182/blood-2008-07-167510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/19506302>.
- Stroes, Erik S, Melchior C Nierman, Janneke J Meulenberg, Remco Franssen, Jaap Twisk, C Pieter Henny, Mario M Maas, et al. 2008. « Intramuscular Administration of AAV1-lipoprotein Lipase S447X Lowers Triglycerides in Lipoprotein Lipase-deficient Patients ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (12) (décembre): 2303-2304. doi:10.1161/ATVBAHA.108.175620.
- Su, Leonard T, Kapil Gopal, Zhonglin Wang, Xiaoqing Yin, Anthony Nelson, Benjamin W Kozyak, James M Burkman, et al. 2005. « Uniform Scale-independent Gene Transfer to Striated Muscle after Transvenular Extravasation of Vector ». *Circulation* 112 (12) (septembre 20): 1780-1788. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.534008.
- Sudres, Muriel, Séverine Ciré, Virginie Vasseur, Léa Brault, Sylvie Da Rocha, Florence Boisgérault, Christine Le Bec, et al. 2012. « MyD88 Signaling in B Cells Regulates the Production of Th1-dependent Antibodies to AAV ». *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (mai 29). doi:10.1038/mt.2012.101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22643865>.
- Sullivan, D E, S Dash, H Du, N Hiramatsu, F Aydin, J Kolls, J Blanchard, G Baskin, et M A Gerber. 1997. « Liver-directed Gene Transfer in Non-human Primates ». *Human Gene Therapy* 8 (10) (juillet 1): 1195-1206. doi:10.1089/hum.1997.8.10-1195.
- Summerford, C, J S Bartlett, et R J Samulski. 1999. « AlphaVbeta5 Integrin: a Co-receptor for Adeno-associated Virus Type 2 Infection ». *Nature Medicine* 5 (1) (janvier): 78-82. doi:10.1038/4768.
- Summerford, C, et R J Samulski. 1998. « Membrane-associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-associated Virus Type 2 Virions ». *Journal of Virology* 72 (2) (février): 1438-1445.
- Suzuki, Masataka, Terry K Bertin, Geoffrey L Rogers, Racel G Cela, Irene Zolotukhin, Donna J Palmer, Philip Ng, Roland W Herzog, et Brendan Lee. 2013. « Differential Type I Interferon-dependent Transgene Silencing of Helper-dependent Adenoviral Vs. Adeno-associated Viral Vectors in Vivo ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (4) (avril): 796-805. doi:10.1038/mt.2012.277.
- Talbot, Gillian E, Simon N Waddington, Olivia Bales, Rose C Tchen, et Michael N Antoniou. 2010. « Desmin-regulated Lentiviral Vectors for Skeletal Muscle Gene Transfer ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (3) (mars): 601-608. doi:10.1038/mt.2009.267.

- Tanel, Andre, Simone G Fonseca, Bader Yassine-Diab, Rebeka Bordi, Joumana Zeidan, Yu Shi, Clarisse Benne, et Rafick-Pierre Sékaly. 2009. « Cellular and Molecular Mechanisms of Memory T-cell Survival ». *Expert Review of Vaccines* 8 (3) (mars): 299-312. doi:10.1586/14760584.8.3.299.
- Toromanoff, Alice, Oumeya Adjali, Thibaut Larcher, Marcelo Hill, Lydie Guigand, Pierre Chenuaud, Jack-Yves Deschamps, et al. 2010. « Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle ». *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (1) (janvier): 151-160. doi:10.1038/mt.2009.251.
- Toromanoff, Alice, Yan Chérel, Mickaël Guilbaud, Magalie Penaud-Budloo, Richard O Snyder, Mark E Haskins, Jack-Yves Deschamps, et al. 2008. « Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle ». *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (7) (juillet): 1291-1299. doi:10.1038/mt.2008.87.
- Toublanc, Estelle, Abdellatif Benraiss, Delphine Bonnin, Véronique Blouin, Nicole Brument, Nathalie Cartier, Alberto L Epstein, Philippe Moullier, et Anna Salvetti. 2004. « Identification of a Replication-defective Herpes Simplex Virus for Recombinant Adeno-associated Virus Type 2 (rAAV2) Particle Assembly Using Stable Producer Cell Lines ». *The Journal of Gene Medicine* 6 (5) (mai): 555-564. doi:10.1002/jgm.542.
- Unzu, Carmen, Sandra Hervás-Stubbs, Ana Sampedro, Itsaso Mauleón, Uxua Mancheño, Carlos Alfaro, Rafael Enríquez de Salamanca, et al. 2012. « Transient and Intensive Pharmacological Immunosuppression Fails to Improve AAV-based Liver Gene Transfer in Non-human Primates ». *Journal of Translational Medicine* 10: 122. doi:10.1186/1479-5876-10-122.
- Urabe, Masashi, Chuantian Ding, et Robert M Kotin. 2002. « Insect Cells as a Factory to Produce Adeno-associated Virus Type 2 Vectors ». *Human Gene Therapy* 13 (16) (novembre 1): 1935-1943. doi:10.1089/10430340260355347.
- Vandenbergh, Luk H, Lili Wang, Suryanarayan Somanathan, Yan Zhi, Joanita Figueredo, Roberto Calcedo, Julio Sanmiguel, et al. 2006. « Heparin Binding Directs Activation of T Cells Against Adeno-associated Virus Serotype 2 Capsid ». *Nature Medicine* 12 (8) (août): 967-971. doi:10.1038/nm1445.
- Vandendriessche, T, L Thorrez, A Acosta-Sanchez, I Petrus, L Wang, L Ma, L DE Waele, et al. 2007. « Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 5 (1) (janvier): 16-24. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02220.x.
- Veron, Philippe, Valérie Allo, Christel Rivière, Jacky Bernard, Anne-Marie Douar, et Carole Masurier. 2007a. « Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2 ». *Journal of Virology* 81 (10) (mai): 5385-94. doi:10.1128/JVI.02516-06.
- Veron, Philippe, Sylvie Boutin, Samia Martin, Laurence Chaperot, Joel Plumas, Jean Davoust, et Carole Masurier. 2009. « Highly efficient transduction of human plasmacytoid dendritic cells without phenotypic and functional maturation ». *Journal of Translational Medicine* 7: 10. doi:10.1186/1479-5876-7-10.
- Veron, Philippe, Christian Leborgne, Virginie Monteilhet, Sylvie Boutin, Samia Martin, Philippe Moullier, et Carole Masurier. 2012. « Humoral and Cellular Capsid-specific Immune Responses to Adeno-associated Virus Type 1 in Randomized Healthy

- Donors ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (12) (juin 15): 6418-6424. doi:10.4049/jimmunol.1200620.
- Vignali, Dario A A, Lauren W Collison, et Creg J Workman. 2008. « How Regulatory T Cells Work ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (7) (juillet): 523-532. doi:10.1038/nri2343.
- Vyas, Jatin M, Annemarie G Van der Veen, et Hidde L Ploegh. 2008. « The known unknowns of antigen processing and presentation ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (8) (août): 607-18. doi:10.1038/nri2368.
- Wagner, J A, T Reynolds, M L Moran, R B Moss, J J Wine, T R Flotte, et P Gardner. 1998. « Efficient and Persistent Gene Transfer of AAV-CFTR in Maxillary Sinus ». *Lancet* 351 (9117) (juin 6): 1702-1703. doi:10.1016/S0140-6736(05)77740-0.
- Wang, L, J-P Louboutin, P Bell, J Greig, Y Li, D Wu, et J M Wilson. 2011. « Muscle-directed Gene Therapy for Hemophilia B with More Efficient and Less Immunogenic AAV Vectors ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* (août 25). doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04491.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21883883>.
- Wang, Lili, Roberto Calcedo, Peter Bell, Jianping Lin, Rebecca L Grant, Don L Siegel, et James M Wilson. 2011. « Impact of Pre-Existing Immunity on Gene Transfer to Nonhuman Primate Liver with Adeno-Associated Virus 8 Vectors ». *Human Gene Therapy* (juin 8). doi:10.1089/hum.2011.031. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476868>.
- Wang, Lili, Roberto Calcedo, Huan Wang, Peter Bell, Rebecca Grant, Luk H Vandenberghe, Julio Sanmiguel, Hiroki Morizono, Mark L Batshaw, et James M Wilson. 2010. « The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (1) (janvier): 126-134. doi:10.1038/mt.2009.245.
- Wang, Lixin, Eric Dobrzynski, Alexander Schlachterman, Ou Cao, et Roland W Herzog. 2005. « Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response ». *Blood* 105 (11) (juin 1): 4226-4234. doi:10.1182/blood-2004-03-0848.
- Wang, Z, H-I Ma, J Li, L Sun, J Zhang, et X Xiao. 2003. « Rapid and Highly Efficient Transduction by Double-stranded Adeno-associated Virus Vectors in Vitro and in Vivo ». *Gene Therapy* 10 (26) (décembre): 2105-2111. doi:10.1038/sj.gt.3302133.
- Wang, Zejing, Christian S Kuhr, James M Allen, Michael Blankinship, Paul Gregorevic, Jeffrey S Chamberlain, Stephen J Tapscott, et Rainer Storb. 2007. « Sustained AAV-mediated Dystrophin Expression in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy with a Brief Course of Immunosuppression ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 15 (6) (juin): 1160-1166. doi:10.1038/sj.mt.6300161.
- Wang, Zejing, Rainer Storb, Christine L Halbert, Glen B Banks, Tiffany M Butts, Eric E Finn, James M Allen, A Dusty Miller, Jeffrey S Chamberlain, et Stephen J Tapscott. 2012. « Successful Regional Delivery and Long-term Expression of a Dystrophin Gene in Canine Muscular Dystrophy: a Preclinical Model for Human Therapies ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (8) (août): 1501-1507. doi:10.1038/mt.2012.111.
- Wang, Zhong, Tong Zhu, Chunping Qiao, Liqiao Zhou, Bing Wang, Jian Zhang, Chunlian Chen, Juan Li, et Xiao Xiao. 2005. « Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart ». *Nature Biotechnology* 23 (3) (mars): 321-328. doi:10.1038/nbt1073.

- Wareing, Mark D, Ashley B Lyon, Bao Lu, Craig Gerard, et Sally R Sarawar. 2004. « Chemokine Expression During the Development and Resolution of a Pulmonary Leukocyte Response to Influenza A Virus Infection in Mice ». *Journal of Leukocyte Biology* 76 (4) (octobre): 886-895. doi:10.1189/jlb.1203644.
- Wareing, Mark D, Ashley Lyon, Chandra Inglis, Francesca Giannoni, Israel Charo, et Sally R Sarawar. 2007. « Chemokine Regulation of the Inflammatory Response to a Low-dose Influenza Infection in CCR2<sup>-/-</sup> Mice ». *Journal of Leukocyte Biology* 81 (3) (mars): 793-801. doi:10.1189/jlb.0506299.
- Weber, Michel, Joseph Rabinowitz, Nathalie Provost, Hervé Conrath, Sébastien Folliot, Delphine Briot, Yan Chérel, 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 ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 7 (6) (juin): 774-781.
- Weller, Melodie L, Panomwat Amornphimoltham, Michael Schmidt, Paul A Wilson, J Silvio Gutkind, et John A Chiorini. 2010. « Epidermal Growth Factor Receptor Is a Co-receptor for Adeno-associated Virus Serotype 6 ». *Nature Medicine* 16 (6) (juin): 662-664. doi:10.1038/nm.2145.
- Wu, Telang, Katrin Töpfer, Shih-Wen Lin, Hua Li, Ang Bian, Xiang Y Zhou, Katherine A High, et Hildegund Cj Ertl. 2011. « Self-complementary AAVs Induce More Potent Transgene Product-specific Immune Responses Compared to a Single-stranded Genome ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* (décembre 20). doi:10.1038/mt.2011.280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186792>.
- Wu, Zhijian, Edward Miller, Mavis Agbandje-McKenna, et Richard Jude Samulski. 2006. « Alpha2,3 and Alpha2,6 N-linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-associated Virus Types 1 and 6 ». *Journal of Virology* 80 (18) (septembre): 9093-9103. doi:10.1128/JVI.00895-06.
- Xia, Haibin, Qinwen Mao, Steven L Eliason, Scott Q Harper, Inês H Martins, Harry T Orr, Henry L Paulson, Linda Yang, Robert M Kotin, et Beverly L Davidson. 2004. « RNAi Suppresses Polyglutamine-induced Neurodegeneration in a Model of Spinocerebellar Ataxia ». *Nature Medicine* 10 (8) (août): 816-820. doi:10.1038/nm1076.
- Xiao, W, N Chirmule, S C Berta, B McCullough, G Gao, et J M Wilson. 1999. « Gene Therapy Vectors Based on Adeno-associated Virus Type 1 ». *Journal of Virology* 73 (5) (mai): 3994-4003.
- Xiao, X, J Li, et R J Samulski. 1996. « Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector ». *Journal of Virology* 70 (11) (novembre): 8098-8108.
- . 1998. « Production of High-titer Recombinant Adeno-associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus ». *Journal of Virology* 72 (3) (mars): 2224-2232.
- Xie, Qing, Weishu Bu, Smita Bhatia, Joan Hare, Thayumanasamy Somasundaram, Arezki Azzi, et Michael S Chapman. 2002. « The Atomic Structure of Adeno-associated Virus (AAV-2), a Vector for Human Gene Therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16) (août 6): 10405-10410. doi:10.1073/pnas.162250899.
- Yan, Z, Y Zhang, D Duan, et J F Engelhardt. 2000. « Trans-splicing Vectors Expand the Utility of Adeno-associated Virus for Gene Therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12) (juin 6): 6716-6721.

- Yang, N S, J Burkholder, B Roberts, B Martinell, et D McCabe. 1990. « In Vivo and in Vitro Gene Transfer to Mammalian Somatic Cells by Particle Bombardment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24) (décembre): 9568-9572.
- Ylä-Herttuala, Seppo. 2012. « Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (10) (octobre): 1831-1832. doi:10.1038/mt.2012.194.
- Zaiss, Anne K, Matthew J Cotter, Lindsay R White, Sharon A Clark, Norman C W Wong, V Michael Holers, Jeffrey S Bartlett, et Daniel A Muruve. 2008. « Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors ». *Journal of Virology* 82 (6) (mars): 2727-40. doi:10.1128/JVI.01990-07.
- Zaiss, Anne-Kathrin, Qiang Liu, Gloria P Bowen, Norman C W Wong, Jeffrey S Bartlett, et Daniel A Muruve. 2002. « Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors ». *Journal of Virology* 76 (9) (mai): 4580-90.
- Zhang, Ping, Xiaoyan Luo, Andrew Bird, Songtao Li, et Dwight D Koeberl. 2012. « Deficiency in MyD88 Signaling Results in Decreased Antibody Responses to an Adeno-Associated Virus Vector in Murine Pompe Disease ». *BioResearch Open Access* 1 (3) (juin): 109-114. doi:10.1089/biores.2012.0217.
- Zheng, Yan, Yuanyuan Zha, et Thomas F Gajewski. 2008. « Molecular Regulation of T-cell Anergy ». *EMBO Reports* 9 (1) (janvier): 50-55. doi:10.1038/sj.embor.7401138.
- Zhong, Li, Baozheng Li, Cathryn S Mah, Lakshmanan Govindasamy, Mavis Agbandje-McKenna, Mario Cooper, Roland W Herzog, et al. 2008. « Next Generation of Adeno-associated Virus 2 Vectors: Point Mutations in Tyrosines Lead to High-efficiency Transduction at Lower Doses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (22) (juin 3): 7827-7832. doi:10.1073/pnas.0802866105.
- Zhou, S, J E Murphy, J A Escobedo, et V J Dwarki. 1998. « Adeno-associated Virus-mediated Delivery of Erythropoietin Leads to Sustained Elevation of Hematocrit in Nonhuman Primates ». *Gene Therapy* 5 (5) (mai): 665-670. doi:10.1038/sj.gt.3300648.
- Zhou, Xiaohuai, Xinghua Zeng, Zhenghong Fan, Chengwen Li, Thomas McCown, R Jude Samulski, et Xiao Xiao. 2008. « Adeno-associated Virus of a Single-polarity DNA Genome Is Capable of Transduction in Vivo ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (3) (mars): 494-499. doi:10.1038/sj.mt.6300397.
- Zhu, Jianguo, Xiaopei Huang, et Yiping Yang. 2009. « The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (8) (août): 2388-2398. doi:10.1172/JCI37607.
- Ziegler, Robin J, Scott M Lonning, Donna Armentano, Chester Li, David W Souza, Maribeth Cherry, Christine Ford, et al. 2004. « AAV2 Vector Harboring a Liver-restricted Promoter Facilitates Sustained Expression of Therapeutic Levels of Alpha-galactosidase A and the Induction of Immune Tolerance in Fabry Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 9 (2) (février): 231-240. doi:10.1016/j.ymthe.2003.11.015.
- Zimmerli, Simone C, Alexandre Harari, Cristina Cellera, Florence Vallelian, Pierre-Alexandre Bart, et Giuseppe Pantaleo. 2005. « HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-

- secreting CD8 T Cells Support CD4-independent Proliferation of HIV-1-specific CD8 T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20) (mai 17): 7239-7244. doi:10.1073/pnas.0502393102.
- Zimmermann, Tracy S, Amy C H Lee, Akin Akinc, Birgit Bramlage, David Bumcrot, Matthew N Fedoruk, Jens Harborth, et al. 2006. « RNAi-mediated Gene Silencing in Non-human Primates ». *Nature* 441 (7089) (mai 4): 111-114. doi:10.1038/nature04688.
- Zincarelli, Carmela, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo, Walter J Koch, et Joseph E Rabinowitz. 2010. « Comparative Cardiac Gene Delivery of Adeno-associated Virus Serotypes 1-9 Reveals That AAV6 Mediates the Most Efficient Transduction in Mouse Heart ». *Clinical and Translational Science* 3 (3) (juin): 81-89. doi:10.1111/j.1752-8062.2010.00190.x.
- Zincarelli, Carmela, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo, et Joseph E Rabinowitz. 2008. « Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (6) (juin): 1073-1080. doi:10.1038/mt.2008.76.

Les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAVr) sont des outils de choix pour la thérapie génique. En absence d'une réponse immune, ils permettent une expression à long terme du transgène s'ils sont administrés en intramusculaire (IM). Néanmoins, cette voie ne permet pas de cibler un nombre suffisant de muscles pour le traitement de myopathies et est souvent associée à une réponse immune envers le produit du transgène. Cette immunotoxicité pourrait-être due à une concentration du vecteur *in situ*, résultant en une interaction rapide et importante du vecteur avec le système immunitaire de l'hôte, comme nous l'avons confirmé chez la souris. La voie locorégionale (LR), qui consiste à injecter le vecteur par voie intraveineuse sous pression dans un membre isolé, apparait aujourd'hui comme une alternative attractive. Elle permet de transduire efficacement les muscles du membre injecté, sans induire de rejet du produit du transgène. Pour confirmer ces observations ainsi qu'évaluer l'impact du type de promoteur sur l'immunotoxicité de la voie LR, des primates ont été injectés avec un vecteur codant pour une protéine immunogène sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire ou alors spécifique du muscle. Nos résultats montrent que, quel que soit le promoteur, la voie LR permet une expression à long terme du transgène immunogène dans le muscle malgré la survenue d'une réponse immune spécifique. Contrairement à la voie IM, la voie LR ne semble pas entraîner de signaux inflammatoires *in situ* suffisants pour induire une réponse immune délétère envers le transgène. Cette voie apparait donc comme prometteuse pour le traitement de myopathies par thérapie génique à l'aide d'AAVr.

**Mots-clés : vecteur AAV, transfert de gène, muscle, voie d'administration, réponse immune, organes lymphoïdes, signaux inflammatoires**

---

Adeno-associated viral (AAV) vectors are promising tools for gene therapy. In the absence of any immune response, a single intramuscular (IM) injection can result in long-term transgene expression. However, this mode of delivery is not able to target large skeletal muscle territories and is often associated to the immune rejection of the transgene product in large animal models. This immunotoxicity could be explained by an *in situ* vector concentration resulting in early and strong interactions between the vector and the host immune system, as we confirmed in a mouse model. As an alternative, locoregional (LR) mode of delivery could be an attractive alternative. It consists in an isolated limb perfusion under pressure. LR was shown to allow the transduction of large skeletal muscle areas in the injected limb and without inducing transgene rejection. To confirm these observations, and in order to evaluate the impact of the promoter type on vector-associated immunotoxicity, non-human primates were injected with an AAV vector encoding an immunogenic protein under the control of either the ubiquitous CMV or the desmin muscle-specific promoters. Our results show that, whatever the promoter used, LR route leads to persisting transgene expression in the muscle despite a specific immune response. In contrast to IM delivery, LR route seems to result in insufficient *in situ* inflammatory signals to induce immune transgene rejection. In conclusion, LR mode of administration nowadays appears promising for AAV-based gene therapy of myopathies.

**Keywords: AAV vector, gene transfer, muscle, administration route, immune response, lymphoid organs, inflammatory signals**