

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**ÉTUDE DES FACTEURS MODULANT LE TRANSFERT
DE GÈNE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE
PRIMATE À L'AIDE D'UN AAV RECOMBINANT**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Médecine
Spécialité : Virologie

*présentée
et soutenue publiquement par*

TOROMANOFF Alice

le 31 Octobre 2008, devant le jury ci-dessous

Président du jury : Dr. Ignacio Anegon
Rapporteurs : Pr. Serge Herson
Pr. Jean-Christophe Pages
Examineur : Pr. Fatima Bosch
Directeur de thèse : Dr. Philippe Moullier

Liste des abréviations

AAT : alpha-1-antitrypsine

AAV : *adeno-associated virus*

AAVr : *recombinant adeno-associated virus*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messenger

BMD : Dystrophie musculaire de Becker

CAG : promoteur chimère de la β -actine de poulet fusionné à l'enhancer du promoteur précoce du Cytomégalovirus

CD : cellule dendritique

cm : macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*)

cmEpo : érythropoïétine de macaque cynomolgus

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

CsCl : chlorure de césium

CTLA4 : *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*

db : double brin

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

Dox : doxycycline

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

Epo : érythropoïétine

FIX : facteur IX de la coagulation

GFP : *green fluorescent protein*

GMP : *Good Manufacturing Procedure*

gsg : γ -sarcoglycan

HIV : Human Immunodeficiency Virus

HSV : Herpes Simplex virus

Ht : hématocrite

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

IM : intramusculaire

ITR : *inverted terminal repeat*

IV : intraveineux

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

LacZ: gène de la β -galactosidase d'E. coli

LAM-PCR : *Linear-amplification-mediated Polymerase Chain Reaction*

MAC : *membrane attack complex*

MAP-kinases : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

Mb : mégabase

MCK : *Muscle Creatine Kinase*

mdx (souris) : modèle murin de la myopathie de Duchenne

mEpo : érythropoïétine murine

MMF : mycophénolate mofétil

MOI : multiplicité d'infection

MPS : mucopolysaccharidose

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

NK : *Natural Killer*

pi : particules infectieuses

pA : signal de polyadénylation

pb : paire de base

PBMC : *peripheral blood mononuclear cells*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PEG : polyéthylène glycol

PGK : phosphoglycerol kinase

PTM : *pre-trans-splicing molecule*

RCA : Replication Center Assay

RT-PCR : *Reverse Transcriptase PCR*

rtTA : *reverse tetracycline controlled transactivator*

sb : simple brin

scAAV : *self-complementary Adeno-Associated Virus*

SIV: *Simian Immunodeficiency Virus*

SMaRT : *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing*

SRBC : *Sheep red blood cell*

TCR : Récepteur des lymphocytes T

TNF : *tumor necrosis factor*

trs : *terminal resolution site*

tTA : *tetracycline controlled transactivator*

vg : *vector genome*

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

SOMMAIRE

ILLUSTRATIONS.....	5
Avant-propos.....	6
INTRODUCTION.....	7
I. La thérapie génique	8
A. Généralités	8
B. Le transfert de gène	9
1. Les différents vecteurs.....	10
2. Choix d'une stratégie de transfert de gène	12
3. Essais cliniques et transfert de gène	13
II. L'AAV recombinant : vecteur de transfert de gène	14
A. L'AAV sauvage	14
B. L'AAV recombinant.....	17
C. Transfert de gène <i>in vivo</i>	18
1. Mécanisme de transduction et persistance du génome.....	18
<i>a. Entrée dans la cellule et transport intracellulaire</i>	<i>18</i>
<i>b. Devenir du génome viral</i>	<i>20</i>
2. Les différents tropismes cellulaires.....	20
3. Limites liées à l'utilisation d'AAVr en transfert de gène.....	22
<i>c. Taille du génome à encapsider</i>	<i>22</i>
<i>d. Nouveaux tropismes cellulaires</i>	<i>23</i>
<i>e. Les AAV recombinants double brin.....</i>	<i>25</i>
<i>f. Immunogénicité.....</i>	<i>27</i>
4. Essais cliniques utilisant l'AAVr	27

III. AAVr et réponse immunitaire	28
A. Généralités	28
1. Le système immunitaire et infection virale	28
a. <i>L'immunité innée</i>	29
b. <i>L'immunité adaptative et ses acteurs</i>	30
2. AAVr et réponse immunitaire.....	36
B. La réponse immunitaire innée contre les vecteurs AAVr.....	39
C. La réponse immunitaire adaptative contre les vecteurs AAVr	41
1. Réponse humorale	41
2. Réponse cellulaire	42
3. Stratégies développées pour s'affranchir des réponses anti-capside.....	44
a. <i>Immunosuppression transitoire</i>	44
b. <i>Modifications de la capsid</i> e	49
c. <i>Utilisation de sérotypes différents</i>	49
D. Réponse immunitaire contre le produit du transgène	50
1. Réponse humorale	50
2. Réponse cellulaire	51
3. Facteurs influençant la réponse anti-transgène	52
a. <i>Voie d'administration et tissu-cible</i>	52
b. <i>Immunogénicité du transgène</i>	54
c. <i>Quantité de protéine synthétisée</i>	55
d. <i>Le sérotype utilisé</i>	55
4. Vaccination à l'aide de vecteurs AAVr.....	56
IV. Transfert de gène dans le muscle squelettique à l'aide d'AAVr	57
A. Généralités	57
B. L'injection intramusculaire d'un AAVr et ses limites	58
C. Autres voies d'administration d'un AAVr ciblant le muscle	60
D. Sérotypes d'AAVr possédant un tropisme musculaire.....	62
E. Biodistribution du vecteur	63
F. Régulation de l'expression du transgène	66
G. Devenir du génome viral dans les cellules musculaires	71
H. Essais cliniques en cours dans le muscle.....	72
1. Les maladies métaboliques	72

a. <i>L'hémophilie B</i>	72
b. <i>Déficit en alpha1-antitrypsine (AAT)</i>	74
c. <i>Déficit en lipoprotéine lipase (LPL)</i>	75
2. Les dystrophies musculaires	76
CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE	78
I. Utilisation d'un gène rapporteur.....	79
II. Le système de régulation Tet-On.....	81
III. Objectifs de la thèse	83
RESULTATS	84
I. Evaluation <i>in vivo</i> du système de régulation TetR-KRAB	85
A. Matériels et méthodes.....	85
1. Constructions plasmidiques	85
2. Production des AAV recombinants.....	86
3. Tests de fonctionnalité <i>in vitro</i>	86
4. Expérimentation animale	86
5. Mesure de l'Ht et dosage de l'Epo sérique.....	87
B. Résultats.....	87
1. Construction du vecteur AAVr	87
2. Validation <i>in vitro</i>	89
3. Suivi de l'expression du transgène <i>in vivo</i>	90
C. Discussion et perspectives	93
1. TetR-KRAB est fonctionnel dans un contexte AAVr.....	93
2. Fuite d'expression du transgène Epo	94
3. Problème rencontré avec certaines constructions	95
4. Comparaison des systèmes TetR-KRAB et Tet-On chez la souris.....	96
5. Perspectives	97

II. Relation entre voie d'administration, sérotype, biodistribution et système immunitaire après transfert de gène dans le muscle squelettique de primate à l'aide d'AAVr	98
A. Premier article	99
B. Deuxième article	113
C. Discussion générale des deux articles	126
1. Mise au point de l'administration RI d'un AAVr chez le macaque.....	127
2. Profils de transduction obtenus.....	129
a. <i>Expression du transgène</i>	129
b. <i>Transduction du tissu cible</i>	130
c. <i>Fuite du vecteur dans la circulation</i>	132
d. <i>Biodistribution du transgène</i>	134
e. <i>Transduction des gonades</i>	135
f. <i>Transduction du foie</i>	136
3. Le LEA29Y seul n'est pas suffisant pour inhiber la réponse anti-transgène	138
4. La voie RI est peu immunogène	140
5. Immunotoxicité observée après une injection IM d'AAVr	143
a. <i>Observation surprenante chez un des macaques de l'étude</i>	143
b. <i>Développement d'anticorps anti-capside AAVr</i>	144
c. <i>Présence d'infiltrats inflammatoires</i>	145
d. <i>Pourquoi la voie intramusculaire est-elle immunogène ?</i>	147
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	149
 ARTICLE ANNEXE.....	153
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

ILLUSTRATIONS

FIGURES :

<u>Figure 1</u> : Les essais cliniques dans le monde	14
<u>Figure 2</u> : Organisation génomique de l'AAV2 sauvage	15
<u>Figure 3</u> : Organisation génomique de l'AAV recombinant	17
<u>Figure 4</u> : Mécanismes de transduction d'un AAV recombinant	19
<u>Figure 5</u> : Conception de nouveaux variants d'AAVr	25
<u>Figure 6</u> : Comparaison entre un AAVr conventionnel et un AAVr double brin	26
<u>Figure 7</u> : Activation d'un lymphocyte T.....	32
<u>Figure 8</u> : Les différents signaux de costimulation et leur effet	33
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique du réseau de costimulation des lymphocytes T	34
<u>Figure 10</u> : Représentation des différentes interactions entre AAVr, CD et cellule-cible...38	
<u>Figure 11</u> : Drogues immunosuppressives et leur site d'action.....	46
<u>Figure 12</u> : Mode d'action du CTLA4-Ig.....	47
<u>Figure 13</u> : Evénements immunologiques pouvant survenir suite à une IM d'AAVr	59
<u>Figure 14</u> : Représentation du système de régulation Rapamycine	68
<u>Figure 15</u> : Représentation des différents systèmes de régulation Tétracycline	70
<u>Figure 16</u> : Modèle de régulation Tet-On développé au laboratoire.....	82
<u>Figure 17</u> : Structure des plasmides AAV-Epo/TetR-KRAB et AAV-Epo/rtTA	88
<u>Figure 18</u> : Test de fonctionnalité <i>in vitro</i> des vecteurs AAVr1-TetR-KRAB	89
<u>Figure 19</u> : Suivi de l'hématocrite et de l'Epo sérique des souris injectées.....	91
<u>Figure 20</u> : Suivi de l'Ht et de l'Epo sérique du groupe PGK-FOR.....	93
<u>Figure 21</u> : Comparaison du système Tet-On et TetR-KRAB chez la souris.....	96
<u>Figure 22</u> : Histologie d'un muscle 5 ou 8 jours post-RI.....	127
<u>Figure 23</u> : CPK et kaliémie en fonction du mode d'administration de l'AAVr	129

TABLEAUX :

Tableau 1 : Principaux groupes de vecteurs utilisés en transfert de gène	12
Tableau 2 : Sérotypes optimaux selon les tissus pour un transfert de gène efficace	21
Tableau 3 : Essais cliniques <i>in vivo</i> au moyen d'AAV recombinants depuis 1989	28
Tableau 4 : Détection de particules infectieuses dans le sérum par RCA.....	133
Tableau 5 : Quantification par Q-PCR du nombre de copies du transgène dans le foie....	137

AVANT-PROPOS

L'*Adeno-Associated Virus* recombinant (AAVr) apparaît comme un vecteur de choix pour la thérapie génique. L'évaluation *in vivo* des vecteurs AAVr a montré que le transfert de gène était efficace et stable dans de nombreux organes comme le muscle, le foie, le poumon, le système nerveux central ou la rétine (Coura Rdos and Nardi, 2007).

L'utilisation d'AAVr dans des modèles murins a montré que ce vecteur était faiblement immunogène contrairement à d'autres (Jooss *et al.*, 1998; Zaiss *et al.*, 2002), même si l'injection d'AAVr s'accompagne souvent du développement d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid du vecteur. Ces anticorps n'altèrent pas l'efficacité du transfert de gène, mais ils empêchent une seconde administration d'un AAVr du même sérotype (Chirmule *et al.*, 2000).

Cependant, l'efficacité du transfert de gène dans les modèles grands animaux (chien, primate) ou chez l'homme a été inhibée par le développement d'une réponse immunitaire humorale et cytotoxique contre la capsid AAVr et/ou le produit du transgène (Favre *et al.*, 2002; Manno *et al.*, 2006; Mingozzi and High, 2007; Sabatino *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007b).

Les vecteurs AAVr étant de plus en plus utilisés en essais cliniques, chercher les facteurs impliqués dans l'émergence de telles réponses immunitaires est indispensable.

Ce travail de thèse a eu plusieurs objectifs ayant pour finalité commune l'obtention d'une expression à long terme d'un transgène apporté par un vecteur AAVr dans le muscle squelettique de macaque :

- 1) l'évaluation chez le primate du système de régulation TetR-KRAB, potentiellement peu immunogène
- 2) l'évaluation d'un protocole d'immunosuppression afin de prévenir toute réponse immune suite au transfert de gène à l'aide d'un AAVr dans le muscle squelettique de primate.
- 3) l'étude de certains facteurs modulant l'efficacité du transfert de gène à l'aide d'AAVr dans le muscle squelettique de primate et intervenant dans le développement de réponses immunes.

INTRODUCTION

I. La thérapie génique

A. Généralités

L'objectif de la thérapie génique est de corriger ou ralentir la progression d'une maladie, qu'elle soit héréditaire ou acquise.

La thérapie génique actuelle s'articule autour de plusieurs stratégies différentes :

- Remplacer le gène défectueux dans les cellules malades, par l'introduction dans la cellule d'une copie normale d'un gène sous forme d'ADNc. Le transfert de gène, technique la plus développée à ce jour, est particulièrement adapté aux mutations entraînant une perte de fonction.
- Modifier l'ARN messager défectueux dont l'expression peut avoir des conséquences délétères. Une des stratégies développées, le saut d'exon, apparaît comme prometteuse dans le cas où l'exon muté n'est pas indispensable à la fonction de la protéine (Gorman *et al.*, 1998; Goyenvallée *et al.*, 2004). Une autre stratégie en cours d'évaluation, le trans-épissage (ou SMaRT), tente de réparer l'ARN muté par la séquence sauvage dans sa totalité. Des PTM (*pre-trans-splicing molecule*) se fixant spécifiquement à la séquence de l'ARN pré-messager à corriger induisent des événements de *trans-épissage* afin de créer une molécule d'ARN réparée. Cette technique, qui a l'avantage de maintenir la régulation endogène et d'éliminer tout risque d'expression ectopique de la protéine corrigée, n'a pas encore totalement prouvé son efficacité et sa spécificité de réparation *in vivo* (Chao *et al.*, 2003; Mansfield *et al.*, 2004; Mansfield *et al.*, 2003; Puttaraju *et al.*, 1999).
- Réprimer l'expression d'un gène qui lorsqu'il est muté, engendre un gain de fonction délétère, ou inhiber un site d'épissage muté qui engendre l'expression d'un produit anormalement épissé aux conséquences délétères pour l'individu. L'utilisation de l'ARN interférence semble dans ce cas prometteuse (Pelletier *et al.*, 2006).
- Réparer directement le gène muté au niveau de la séquence ADN. Cette technique est basée sur l'utilisation de protéines chimériques de type « *zinc finger Nuclease* ». Ces protéines sont composées d'un domaine de liaison spécifique de l'ADN à corriger et d'une endonucléase. Elles sont donc capables de couper de l'ADN double brin à des sites spécifiques. Simultanément, une séquence ADN correspondant à la séquence sauvage du gène muté est introduite dans la cellule, et agit comme substrat pour la réparation de l'ADN muté par recombinaison homologue (Porteus and Carroll, 2005). Cette réparation par recombinaison homologue (*targeted gene repair*) est aussi possible avec un vecteur

AAV (Hendrie and Russell, 2005) ou des oligos (Parekh-Olmedo *et al.*, 2005). Cette technique présente un avantage évident : la protéine corrigée est exprimée dans des conditions physiologiques. Cependant, cette stratégie très attractive est encore loin de l'application clinique.

- Introduire un gène « toxique » afin de détruire les cellules cibles. Cette approche est particulièrement utilisée pour détruire des cellules tumorales, par l'expression d'un gène « suicide » par exemple (Li *et al.*, 2005).

La première stratégie citée est la technique la plus développée à ce jour, et fait déjà l'objet de plusieurs applications cliniques dans le monde. La suite de ce mémoire de thèse se rapportera uniquement à cette technique qui sera nommée transfert de gène.

B. Le transfert de gène

L'ADN seul franchit peu efficacement la barrière que constitue la membrane cellulaire. Le transfert d'ADN nu présente ainsi de nombreux inconvénients (voir tableau 1). C'est pourquoi l'introduction dans une cellule malade d'une copie fonctionnelle du gène muté nécessite l'utilisation d'un vecteur. Ce vecteur doit permettre au gène thérapeutique de rentrer dans les cellules-cibles, puis de migrer dans le noyau pour y synthétiser la protéine thérapeutique.

Le transfert de gène peut avoir lieu *ex vivo* ou *in vivo*, selon le type de cellules à atteindre et le type de vecteur utilisé.

La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever les cellules-cibles de l'hôte, à les modifier génétiquement en leur apportant le gène thérapeutique à l'aide d'un vecteur, puis à les réintroduire dans l'organisme malade. Cette approche est cependant limitée aux maladies pour lesquelles il est possible de prélever aisément chez l'individu la population cellulaire à corriger (comme les cellules immunitaires du sang ou les cellules de la moelle osseuse).

In vivo, le gène thérapeutique est introduit directement chez l'individu malade par l'intermédiaire d'un vecteur. Un transfert de gène efficace doit permettre d'apporter le transgène à une population cellulaire donnée, où il devra s'exprimer afin de corriger le phénotype anormal. Pour la plupart des maladies dont l'anomalie est intracellulaire, le transgène, pour pouvoir corriger le phénotype, doit être apporté dans un nombre suffisant de cellules affectées. A l'inverse, si le phénotype anormal est dû à une protéine sécrétée absente ou anormale, il suffira que l'expression du transgène permette d'atteindre une quantité suffisante de protéines fonctionnelles pour corriger le phénotype. Ainsi, il est théoriquement

possible de faire exprimer une protéine thérapeutique soluble à partir de n'importe quel type cellulaire, sans nécessairement toucher un grand nombre de cellules. Il faut toutefois veiller à ce que les protéines dont l'expression est ectopique subissent correctement les modifications post-traductionnelles, et ne soient pas produites en quantité trop importante afin d'éviter tout effet toxique potentiel. Une telle approche s'avère cependant impossible pour traiter les maladies dont la protéine doit être apportée au niveau d'un organe possédant une barrière au passage des protéines (comme le cerveau ou l'œil par exemple). Pour ces maladies, le gène codant la protéine fonctionnelle doit être administré directement dans l'organe défectueux.

1. Les différents vecteurs

Il existe deux grands types de vecteurs : les vecteurs viraux ou non viraux (tableau 1).

Les vecteurs non viraux sont principalement des lipides cationiques synthétiques qui, après formation d'un complexe avec l'ADN, permettent au gène thérapeutique de franchir la bicouche lipidique des membranes cellulaires, et ainsi de rentrer dans les cellules (Miller, 1998). Ces vecteurs ont une excellente innocuité et permettent d'apporter dans une cellule un gène de grande taille. Ils sont cependant peu efficaces malgré les nombreux essais pour tenter de corriger des modèles animaux de maladies génétiques, car ils ne permettent d'obtenir qu'une expression transitoire de la protéine thérapeutique, et les plasmides portés par ces vecteurs non-viraux n'ont pas les moyens de migrer vers le noyau (Lechardeur *et al.*, 2005).

Pour augmenter la translocation de l'ADN vers le noyau, différentes approches ont été développées. L'incorporation au plasmide vecteur de séquences spécifiques (nls, facteurs de transcriptions) a ainsi permis d'augmenter l'accumulation de l'ADN injecté dans le noyau des cellules cibles (Vaughan *et al.*, 2006). La fusion du nls au plasmide vecteur a ainsi augmenté significativement l'expression après injection par différentes voies chez la souris (Branden *et al.*, 2001).

Plusieurs essais cliniques menés à l'aide de vecteur non viraux ont été des échecs (peu d'évidences d'expression de la protéine portée par le plasmide, pas de correction du phénotype). Les principales indications sont la mucoviscidose (Montier *et al.*, 2004; Noone *et al.*, 2000), l'hémophilie A (Roth *et al.*, 2001), le déficit en α 1-antitrypsine (Brigham *et al.*, 2000), la maladie de Canavan (Leone *et al.*, 2000), et les dystrophies musculaires (DMD et

BMD) (Romero *et al.*, 2004). Les vecteurs non viraux sont actuellement peu utilisés en clinique.

Les vecteurs viraux sont dérivés de virus sauvages. Afin d'être utilisé comme vecteur, le virus est délété d'une partie ou de la totalité de son génome codant, le rendant non pathogène et défectif pour la réplication, tout en gardant son infectiosité et donc sa capacité à rentrer dans certains types cellulaires caractéristiques du virus utilisé. Le génome viral est ensuite remplacé par le gène thérapeutique, appelé transgène. Classiquement, le transgène est apporté dans une cassette d'expression comportant l'ADN complémentaire (ADNc) du gène, cloné en amont du signal de polyadénylation, et sous contrôle d'un promoteur.

Les virus recombinants sont de très bons vecteurs pour apporter efficacement un gène thérapeutique dans une cellule-cible, que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*. Ils sont les plus adaptés pour traiter les maladies génétiques où une expression permanente est nécessaire : ils permettent au transgène de rentrer facilement dans la cellule cible et de s'exprimer à long terme à des niveaux thérapeutiques.

Les vecteurs viraux sont majoritairement dérivés des rétrovirus parmi lesquels les oncovirus murins (MLV pour *Murine Leukemia Virus*) et les lentivirus, des adénovirus et des virus adéno-associés (AAV, pour *Adeno-Associated Virus*). Le tropisme cellulaire, la taille du génome encapsidé, et l'immunogénicité du vecteur dépendent du virus utilisé (Thomas *et al.*, 2003) (tableau 1).

Type de vecteur		Principaux avantages	Limites	Exemple d'essais cliniques
Vecteurs non viraux	ADN nu ou Vecteurs lipidiques	Ne provoquent aucune réaction immunitaire. La longueur du transgène n'est pas limitée. Leur production est aisée.	Rentrent peu efficacement dans les cellules. Il est difficile de cibler spécifiquement un type cellulaire. L'ADN ainsi apporté ne s'intègre pas : son expression est transitoire	Mucoviscidose (Noone <i>et al.</i> , 2000) Maladie de Canavan (Leone <i>et al.</i> , 2000) Myopathie (Romero <i>et al.</i> , 2004) Déficit en α 1-antitrypsine (Brigham <i>et al.</i> , 2000)
	Vecteurs viraux	Adénovirus	Transduisent très efficacement la majorité des tissus La longueur du transgène jusqu'à 30 kb.	Sont très immunogènes. Expression transitoire (pas d'intégration).
MLV		Intégration du transgène au génome et donc persistance dans les cellules en division.	Longueur du transgène limitée à 8 kb. N'infectent que les cellules en division. S'intègrent au génome de la cellule-cible : possibilité d'activer un oncogène.	SCID-X (Cavazzana-Calvo <i>et al.</i> , 2000) Hémophilie A (Powell <i>et al.</i> , 2003)
Lentivirus		Infectent efficacement les cellules, qu'elles soient en division ou non. Intégration du transgène au génome et donc persistance dans la plupart des cellules.	Longueur du transgène limitée à 8 kb. S'intègrent au génome de la cellule-cible : possibilité d'activer un oncogène.	
AAV		Non pathogènes. Infectent efficacement les cellules, qu'elles soient en division ou non. Le transgène reste sous forme épisomique et peut permettre une expression à long terme. Faiblement immunogènes.	Longueur du transgène limitée à 4,6 kb.	Mucoviscidose (Flotte <i>et al.</i> , 2005; Flotte <i>et al.</i> , 2003; Moss <i>et al.</i> , 2004; Wagner <i>et al.</i> , 2002) Hémophilie B (Jiang <i>et al.</i> , 2006c; Kay <i>et al.</i> , 2000; Manno <i>et al.</i> , 2006) Myopathies (Carter, 2005) Maladie de Canavan (Janson <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 1 : Principaux groupes de vecteurs utilisés en transfert de gène

2. Choix d'une stratégie de transfert de gène

De nombreux paramètres dépendant de la maladie à traiter sont à prendre en compte pour réussir un transfert de gène :

- l'organe responsable du phénotype malade (cellules-cibles)
- l'hétérogénéité génétique : dans le cas d'une maladie génétique, un même phénotype anormal peut être parfois dû à des mutations sur des gènes différents
- la pathogénie et le mode de transmission de la maladie génétique à traiter

- le contrôle du taux d'expression du produit du transgène dans une fenêtre thérapeutique afin d'éviter tout effet toxique
- la prévention d'une éventuelle réponse immunitaire de l'hôte développée contre le vecteur et/ou contre le produit du transgène

En fonction de tous ces paramètres, on choisira la voie d'administration du transgène et le type de vecteur. Le but est de toucher un nombre de cellules suffisant pour modifier le phénotype, avant la mise en place de lésions irréversibles causées par la maladie, et tout en engendrant le moins d'effets secondaires possible.

3. Essais cliniques et transfert de gène

Depuis 1989, de nombreux essais cliniques ont été menés en thérapie génique, majoritairement aux Etats-Unis (66 %). Les vecteurs viraux les plus utilisés sont dérivés des adénovirus (25 %) et des rétrovirus (22 %), et les indications thérapeutiques principales sont les cancers (66,5 %) (figure 1).

Depuis plusieurs années, l'AAV recombinant, par son innocuité, sa persistance à long terme après transfert *in vivo*, et sa capacité à infecter de nombreux types cellulaires quiescents, est de plus en plus utilisé en transfert de gène pour tenter de traiter des maladies génétiques monogéniques.

Le laboratoire de thérapie génique de Nantes s'est focalisé sur l'utilisation de ces vecteurs dérivés de l'AAV pour le traitement de maladies génétiques monogéniques, avec comme finalité l'application clinique.

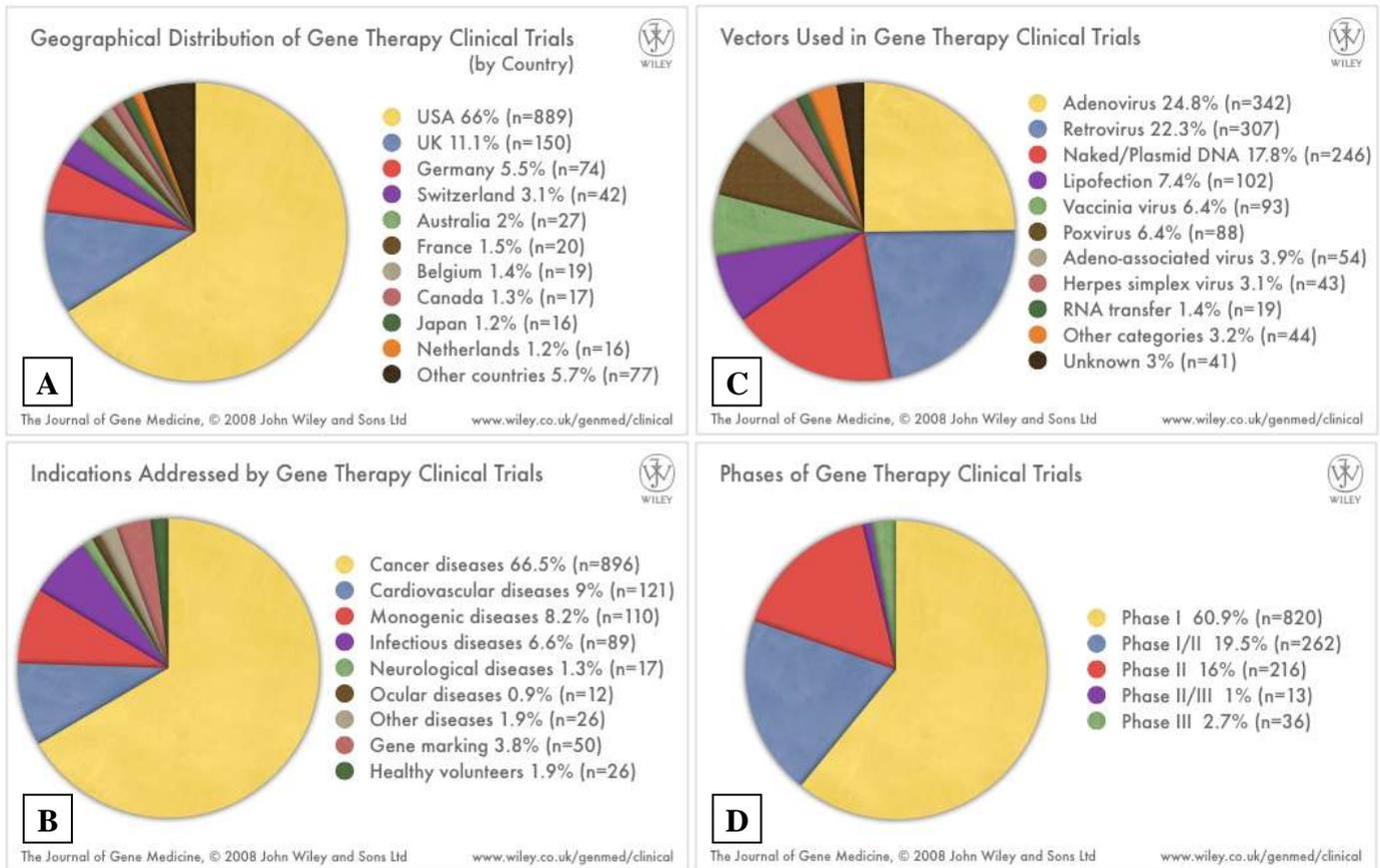


Figure 1 : Les essais cliniques dans le monde. D'après www.wiley.co.uk/genethrapy/clinical.

A- Répartition des essais cliniques dans le monde

B- Distribution selon les indications thérapeutiques

C- Distribution selon les vecteurs utilisés

D- Phases des essais cliniques en cours

II. L'AAV recombinant : vecteur de transfert de gène

A. L'AAV sauvage

L'AAV sauvage est un parvovirus à ADN simple brin linéaire, non enveloppé et de petite taille (environ 20 nm). Il est non pathogène : aucune maladie ne lui est associée. Classé dans le genre des Dépendovirus, l'AAV nécessite, pour se répliquer, une co-infection avec un virus auxiliaire (tels que adénovirus ou herpes virus) (Muzyczka, 1992).

L'AAV sauvage a une organisation génomique simple (figure 2A). Son génome a une taille de 4,7 kilobases (kb) et comporte 2 cadres de lecture : Rep et Cap. Le gène *rep* code 4 protéines régulatrices (Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40) impliquées dans la réplication du génome viral et la régulation des promoteurs viraux. Le gène *cap* code 3 protéines de structure (VP1, VP2 et VP3) composant la capsidie icosaédrique du virus. Deux séquences terminales inversées (ITR pour *inverted terminal repeats*) identiques de 145 paires de bases encadrent le génome viral (figure 2B). Elles portent en *cis* les signaux nécessaires à l'encapsidation, la réplication et l'intégration du virus. Ces ITR sont indispensables au cycle

virale de l'AAV et sont donc les séquences minimales nécessaires dans la génération des AAV recombinants, vecteurs utilisés en thérapie génique.

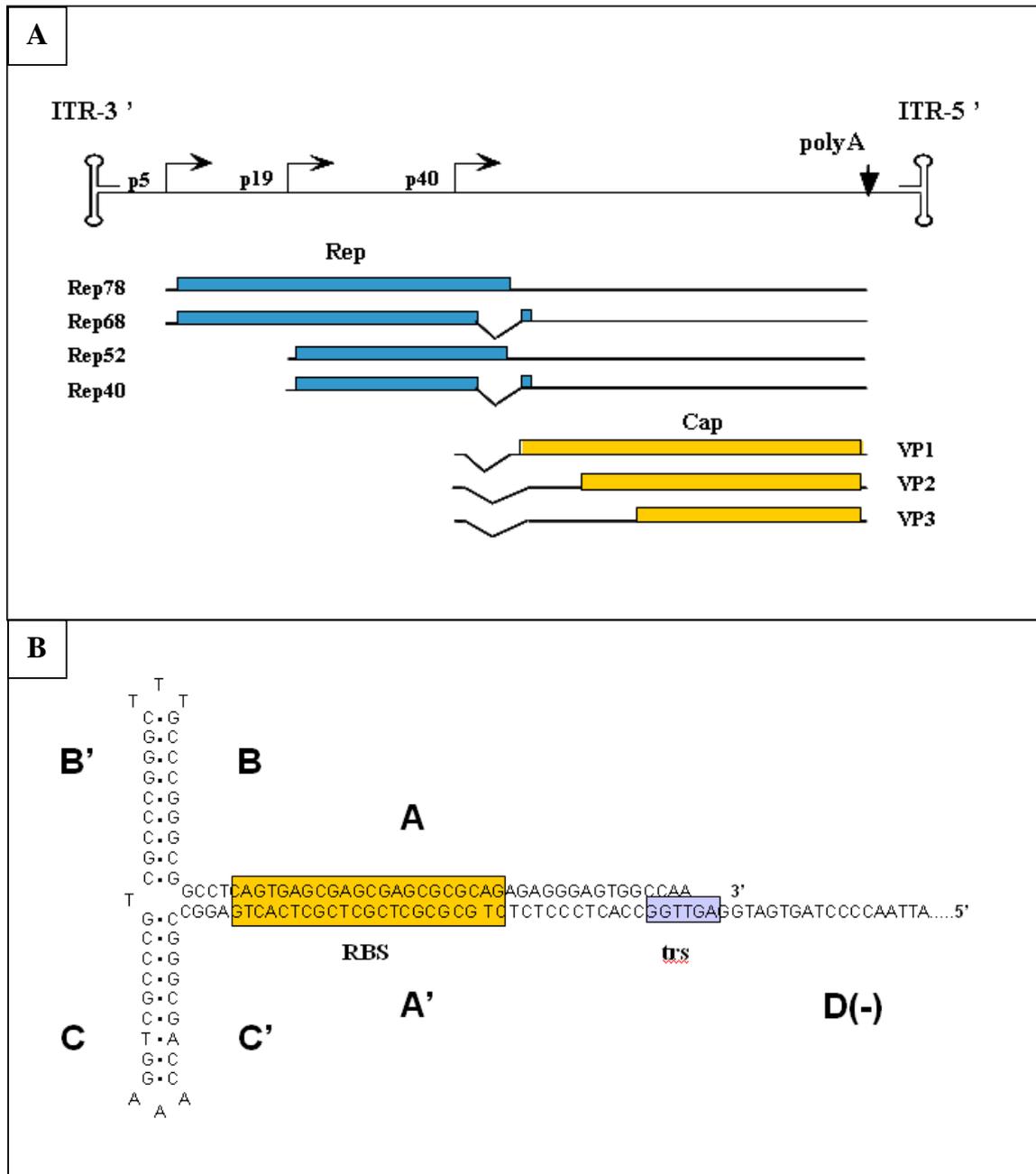


Figure 2 : Organisation génomique de l'AAV2 sauvage

A. Génome de l'AAV2 sauvage. Le génome de l'AAV se compose d'une molécule d'ADN simple brin de 4679 nucléotides, de polarité positive ou négative. Les gènes *rep* et *cap* sont encadrés par les séquences ITR (« *Inverted Terminal Repeats* ») de 145 nucléotides. Les protéines Rep 78, Rep 68, Rep 52 et Rep 40 sont codées par les transcrits initiés aux promoteurs p5 et p19 par épissage alternatif. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont issues de transcrits initiés au promoteur p40.

B. Séquence et structure secondaire de l'ITR 3' de l'AAV2. Structure en épingle à cheveux, repliée sous sa forme native. Le domaine de fixation RBS pour « *Rep binding site* » et le site de coupure spécifique *trs* pour « *terminal resolution site* » des protéines Rep 78/68 sont iniqués. Chaque ITR est composé de 6 régions complémentaires (A/A', B/B' et C/C') de 125 nucléotides et d'une région unique D de 20 nucléotides.

En l'absence de co-infection par un virus auxiliaire, le virus sauvage entre dans une phase de latence qui se caractérise par l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire, en un site spécifique du chromosome 19, le site AAVS1. Cette intégration région-spécifique est bien décrite *in vitro* (Kotin *et al.*, 1992) (Linden *et al.*, 1996) (Philpott *et al.*, 2002) même si elle a récemment été remise en cause (Drew *et al.*, 2007); elle est moins fréquente *in vivo* où l'AAV persiste principalement sous forme épisomique (Chen *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 1999; Schnepf *et al.*, 2005). A la faveur d'une infection ultérieure par un virus auxiliaire, le génome viral est excisé par l'intermédiaire des protéines Rep 78/68. Le génome peut alors être répliqué pour former de nouvelles particules infectieuses.

En présence de virus auxiliaire, l'AAV entre dans une phase productive ou répliquative, qui se caractérise par une synthèse des protéines Rep et Cap associée à une répllication du génome viral. Les protéines structurales s'accumulent rapidement et s'assemblent pour former des capsides vides en moins de vingt minutes (Yuan and Parrish, 2001). Le processus d'insertion du génome simple brin est plus lent. Les protéines Rep 52 et Rep 40, grâce à leur activité hélicase, sont impliquées dans ce processus (King *et al.*, 2001 ; Timpe *et al.*, 2005).

Plus de 100 séquences différentes de capsides d'AAV ont été isolées (Gao *et al.*, 2005). Par définition, un sérotype d'AAV est caractérisé par un profil sérologique unique. Actuellement, 12 sérotypes (AAV1 à 12) ont été décrits (Schmidt *et al.*, 2008). Les sérotypes 1, 2, 3, 4, 6 et 12 ont été isolés comme contaminants dans des stocks d'adénovirus. Les sérotypes 5, 7, 8, 9, 10 et 11 ont été isolés à partir de tissus humains ou simiens.

La séquence entière du génome des différents sérotypes d'AAV a été clonée, sauf pour le sérotype 12. Le sérotype 2 est le premier à avoir été identifié, et est le mieux caractérisé. De plus, bien que l'AAV6 ait le même profil sérologique que l'AAV1 (Gao *et al.*, 2004b), il est considéré comme un sérotype à part entière dans la littérature. Chaque sérotype, de part ses propriétés, a un tropisme cellulaire qui lui est propre.

La nécessité d'un virus *helper* pour se répliquer, la faible immunogénicité et l'innocuité du virus sauvage sont autant de paramètres favorables pour l'utilisation de l'AAV en tant que vecteur pour la thérapie génique.

B. L'AAV recombinant

L'AAV recombinant est dérivé du virus sauvage : le génome viral (les gènes *rep* et *cap*) est remplacé par la séquence ADN d'intérêt (transgène) associée aux éléments de régulation et d'expression nécessaires (promoteur, signal de polyadénylation) et encadré par les 2 ITR (figure 3). Les ITR sont les seules séquences du génome viral conservées car elles sont indispensables en *cis* pour la production des vecteurs (réplication et encapsidation de l'ADN dans les virions) (Grimm *et al.*, 1998).

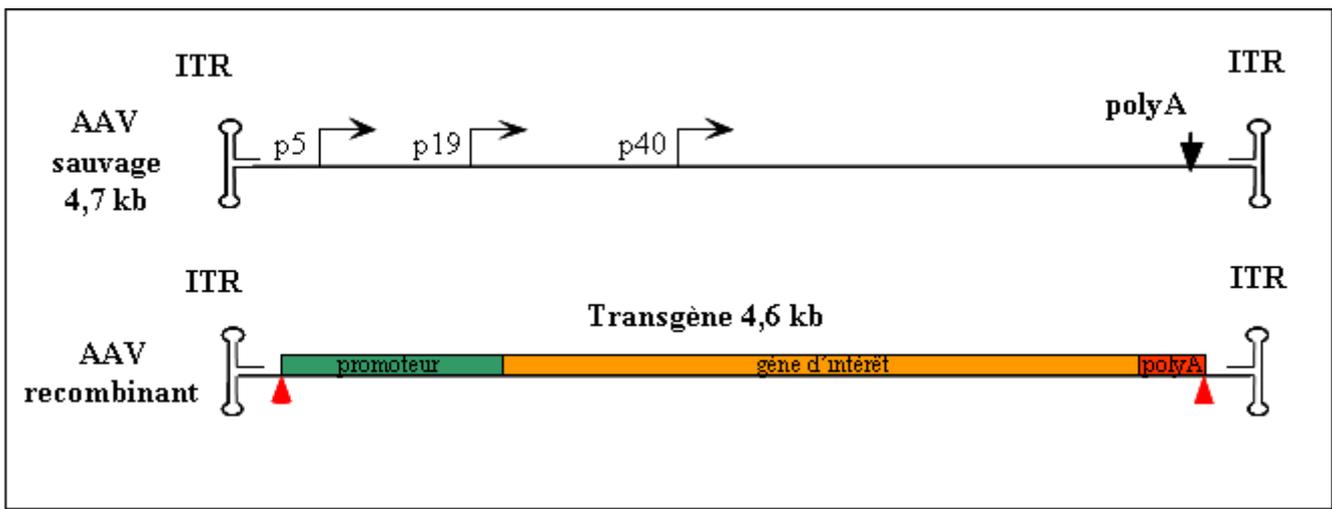


Figure 3 : Organisation génomique de l'AAV recombinant

Le génome des vecteurs (AAVr) est obtenu en remplaçant les gènes *rep* et *cap* de l'AAV par la cassette d'expression du transgène (promoteur, gène d'intérêt, signal de polyadénylation). Les seules séquences virales conservées sont les ITR qui sont nécessaires en *cis* à la réplication et à l'encapsidation du génome recombinant lors de la phase de production. Les fonctions transcomplémentantes sont apportées en *trans* par un plasmide comportant *rep-cap* et les différentes fonctions helper.

La taille de l'ADN (ITR compris) pouvant être encapsidé ne doit pas dépasser 4,9 kb. Au delà de cette taille (correspondant à celle du virus sauvage), l'ADN encapsidé peut être incomplet, ou le rendement de la production des virus recombinants fortement diminué (Dong *et al.*, 1996).

En pratique, les plasmides vecteurs sont souvent clonés entre les ITR de l'AAV2, pour être ensuite encapsidés dans une capsidie d'un autre sérotype : c'est ce qu'on appelle les pseudotypes (Gao *et al.*, 2002; Rabinowitz *et al.*, 2002).

C. Transfert de gène *in vivo*

Un nombre non négligeable de maladies génétiques sont dues à un dysfonctionnement d'un seul organe ou tissu, permettant ainsi de les traiter par thérapie génique. Les tissus-cibles les plus représentés sont : le foie, les muscles squelettique et cardiaque, le système nerveux central, le poumon et le compartiment hématopoïétique.

1. Mécanisme de transduction et persistance du génome

La transduction correspond à une succession d'étapes aboutissant à l'expression du transgène. Pour transduire des cellules, l'AAV recombinant doit se fixer à la membrane cellulaire, transiter du cytoplasme jusqu'au noyau, y entrer et libérer sa copie d'ADN simple brin, qui sera convertie en un ADN double-brin transcriptionnellement actif. Autant d'étapes qui peuvent être limitantes pour un transfert de gène efficace.

a. Entrée dans la cellule et transport intracellulaire

La fixation, l'entrée dans la cellule et la migration vers le noyau sont dépendantes du sérotype d'AAVr (figure 4). Selon les voies intracellulaires impliquées, l'efficacité de transduction sera différente, rendant chaque sérotype plus approprié pour un type cellulaire donné (voir § Les différents tropismes cellulaires).

La 1^{ère} étape du cycle viral de l'AAVr est de se fixer à la membrane plasmique grâce à un récepteur spécifique. Cependant, pour que l'infection soit efficace, des interactions avec des corécepteurs sont également nécessaires.

Le récepteur primaire de l'AAV2, identifié en 1998, est un protéoglycane heparan-sulfate (Summerford and Samulski, 1998). Ses corécepteurs sont le récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGF-R1), l'intégrine $\alpha V\beta 5$, et le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes c-Met (Qing *et al.*, 1999; Sanlioglu *et al.*, 2000; Summerford *et al.*, 1999; Kashiwakura *et al.*, 2005). Des études plus récentes ont décrit d'autres corécepteurs pour l'AAV2 : le récepteur de la laminine (de 37/67 kDa) et l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Akache *et al.*, 2006; Asokan *et al.*, 2006).

Les récepteurs de certains autres sérotypes ont aussi été décrits. Ainsi l'AAV4 se lie aux acides sialiques O-liés, alors que l'AAV5 se lie aux acides sialiques N-liés (Kaludov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2001). Le corécepteur de l'AAV5 a été identifié comme étant le récepteur du facteur de croissance des thrombocytes (PDGFR) (Di Pasquale *et al.*, 2003). L'AAV1 et l'AAV6, dont la capsid ne diffère que par 6 acides aminés, se lient tous les deux aux acides sialiques N-liés (Seiler *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006a; Wu *et al.*, 2006b). Le

récepteur à la laminine est aussi un récepteur pour les sérotypes 3, 8 et 9. L'AAV12 semble ne pas avoir besoin de se lier aux protéoglycanes héparan-sulfate, ni aux acides sialiques pour transduire des cellules. Cette caractéristique le distingue de tous les autres sérotypes (Schmidt *et al.*, 2008).

Une fois fixé à la membrane, l'internalisation de l'AAV2 dans les cellules se fait par endocytose *via* des puits recouverts de clathrine, et selon un mécanisme dynamine dépendant (Bartlett *et al.*, 2000; Duan *et al.*, 1999a; Seisenberger *et al.*, 2001). L'endocytose *via* des vésicules à manteau de clathrine est le mécanisme le plus utilisé par les AAV pour entrer dans les cellules, mais il en existe d'autres selon les sérotypes. L'AAV2 transite ensuite par la voie des endosomes, alors que le transport de l'AAV5 passerait par l'appareil de Golgi (Bantel-Schaal *et al.*, 2002). L'AAV doit ensuite sortir des endosomes pour entrer dans le noyau. Le transport vers le noyau se fait à l'aide des microtubules et microfilaments du cytoplasme (Seisenberger *et al.*, 2001). Le moment de désassemblage de la capsid n'est pas encore clairement identifié : il se situe soit avant soit après l'entrée dans le noyau (Bartlett *et al.*, 2000), et il dépend du sérotype et du type cellulaire (Sipo *et al.*, 2007). Trente minutes à quelques heures sont nécessaires pour que les particules virales se retrouvent dans le noyau après infection (Berns and Giraud, 1996; Ding *et al.*, 2005).

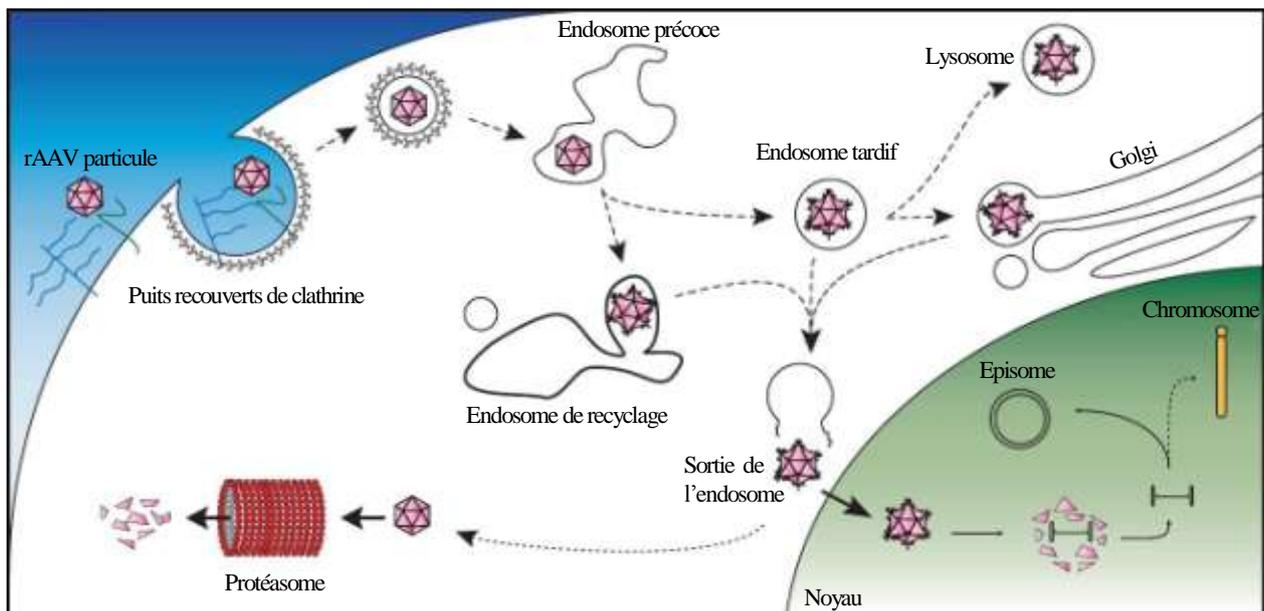


Figure 4 : Mécanismes de transduction d'un AAV recombinant

Adapté de Schultz and Chamberlain, 2008. L'AAVr entre dans la cellule par endocytose après s'être lié à son récepteur. Le transport vers le noyau peut se faire par différentes voies, dont certaines sont représentées sur ce schéma. Le traitement endosomal du vecteur engendre l'externalisation à la surface de la capsid de signaux nucléaires et de domaines reconnus par la phospholipase, permettant ainsi au vecteur de sortir des endosomes pour atteindre le noyau. Une partie du vecteur peut être dégradé par le protéasome ou dans les lysosomes. Le désassemblage de la capsid a probablement lieu dans le noyau, libérant ainsi le génome viral qui sera converti en double brin puis formera des épisomes transcriptionnellement actifs, ou rarement, s'intégrera au génome de la cellule-hôte.

b. Devenir du génome viral

Une fois dans le noyau, le génome viral simple brin (sb) doit être converti en ADN double brin (db) afin d'être transcrit par la machinerie cellulaire. Deux mécanismes permettent cette conversion : (i) la synthèse *de novo* du brin complémentaire par un mécanisme de déplacement de brin médié par les ADN polymérase de la cellule-hôte à partir de l'extrémité 5' de l'ITR 3' ; (ii) l'appariement de brins de polarité inverse. Des recombinaisons intra- et intermoléculaires conduisent à la formation de formes circulaires et de concatémères, qui persistent principalement sous forme d'épisomes transcriptionnellement actifs, du moins dans le foie et le muscle squelettique (Duan *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 2003a; Nakai *et al.*, 2001; Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2005; Yue and Duan, 2003). Diverses études ont montré qu'une grande partie de l'ADN simple brin était dégradée au cours des premières semaines après injection dans le muscle (Xiao *et al.*, 1996) et le foie (Miao *et al.*, 1998). Ensuite, l'expression du transgène augmente rapidement correspondant à la formation d'ADN double brin. Bien qu'apparemment minoritaire, il semble également que l'ADN viral puisse être intégré de façon aléatoire dans le génome de sa cellule hôte (Smith, 2008).

La majorité des formes du génome des AAVr persistant dans le noyau des cellules transduites étant des épisomes, le risque d'insertion de mutations ou d'activation d'oncogène est très réduit. Des études récentes ont mis en évidence un lien entre la formation de tumeurs dans le foie et les événements d'intégration du génome AAV après injection néonatale d'AAVr chez la souris (Donsante *et al.*, 2007; Donsante *et al.*, 2001). Cependant, ces hypothèses sont actuellement controversées. En effet, d'autres études ont montré des résultats contradictoires lorsque l'AAVr est injecté chez des souris adultes (Bell *et al.*, 2006; Bell *et al.*, 2005). Ceci peut être partiellement expliqué par le fait que traiter des souris en période néonatale augmente déjà le risque de formation de tumeurs (Alexander *et al.*, 2008).

2. Les différents tropismes cellulaires

De nombreuses études ont évalué et comparé différents sérotypes d'AAV recombinants pour leur efficacité de transduction de divers tissus *in vivo*. Ces études utilisent pour la majorité des vecteurs hybrides (pseudotypes) portant une cassette d'expression encadrée par les ITR de l'AAV2, et encapsidée dans une capsidie d'un autre sérotype. Ainsi, les différences d'efficacité de transduction observées ne peuvent être attribuées qu'à la capsidie. Comme vu dans le chapitre précédent, chaque sérotype utilise une voie d'entrée spécifique dans la cellule permettant la transduction d'un type cellulaire donné.

Cependant, aucun consensus n'a à ce jour été trouvé afin de déterminer le sérotype le plus performant pour un type cellulaire donné, surtout qu'à l'heure actuelle de nouveaux sérotypes d'AAV émergent encore.

Il est tout de même possible de définir, pour la majorité des organes, les sérotypes optimaux pour un transfert de gène efficace (tableau 2). En effet, certains tissus semblent se transduire facilement par l'AAVr, alors que d'autres ne sont transduits qu'à faible taux, voire pas du tout.

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

D'après Wu *et al.*, 2006; Schultz and Chamberlain, 2008.

Tableau 2 : Sérotypes optimaux selon les tissus pour un transfert de gène efficace

L'AAVr2 a été le premier sérotype utilisé en transfert de gène et est très bien caractérisé. Il présente un tropisme étendu (muscle, foie, rétine, système nerveux central) chez différentes espèces animales, avec une efficacité toutefois modérée.

Depuis, il a été montré que les AAVr1, 6 et 7 permettent de transduire efficacement le muscle strié (Blankinship *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2002; Gregorevic *et al.*, 2004), et plus récemment, des études ont décrit que l'AAVr8 et l'AAVr9 transduisaient les cellules musculaires striées avec une efficacité au moins aussi importante (Inagaki *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2005a; Pacak *et al.*, 2006; Palomeque *et al.*, 2007; Vandendriessche *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005c). Les AAVr8 et 9 sont les deux sérotypes transduisant le mieux le foie (Gao *et al.*, 2002; Inagaki *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2005a). En ce qui concerne le poumon, l'AAVr6 et l'AAVr9 transduisent la plupart des cellules de l'épithélium pulmonaire, alors que l'AAVr5 se limite aux cellules alvéolaires (Bostick *et al.*, 2007; Halbert *et al.*, 2001; Halbert *et al.*, 2007; Seiler *et al.*, 2006). Dans le système nerveux central, les AAVr1, 4, 5, 7 et 8 transduisent les neurones de diverses régions du cerveau (Alisky *et al.*, 2000; Burger *et al.*,

2004; Davidson *et al.*, 2000; Taymans *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2003a). Les sérotypes 1 et 5 transduisent plutôt les cellules épendymaires et les cellules gliales (Davidson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003a). Au niveau de l'œil, les AAVr1, 4, 5, 7, 8 et 9 permettent une transduction efficace de l'épithélium pigmentaire rétinien, et les AAVr5, 7, et 8 transduisent également les photorécepteurs (Allocca *et al.*, 2007; Lebherz *et al.*, 2008; Stieger *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2003). Pour la transduction du pancréas, les AAVr1, 8, et 9 sont les plus efficaces, principalement dans les cellules acineuses (Inagaki *et al.*, 2006; Loiler *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2004). Le rein semble relativement difficile à transduire : les cellules du tube contourné proximal ont pu être faiblement transduites par l'AAVr2 (Takeda *et al.*, 2004), et les glomérules par l'AAVr9 (Bostick *et al.*, 2007). Enfin, l'AAVr1 est capable de transduire le tissu adipeux avec l'aide d'un surfactant non-ionique (Mizukami *et al.*, 2006) (pour revue, Flotte, 2004; Kotin, 1994; Monahan and Samulski, 2000; Mueller and Flotte, 2008; Russell and Kay, 1999; Snyder, 1999).

Il faut aussi garder en mémoire que le sérotype optimal pour chaque tissu-cible peut parfois varier selon l'espèce animale (Davidoff *et al.*, 2005).

De plus, le génome AAVr étant principalement sous formes d'épisomes dans le noyau des cellules transduites, ceux-ci sont perdus (par dégradation ou dilution) dans les populations se multipliant rapidement. Ainsi la stabilité d'expression du transgène observée dans les hépatocytes, les fibres musculaires, les cardiomyocytes et les neurones peut être expliquée par une activité mitotique faible ou absente dans ces populations cellulaires. Au contraire, les hauts taux de prolifération des cellules hématopoïétiques expliquent en partie la faible transduction de celles-ci.

3. Limites liées à l'utilisation d'AAVr en transfert de gène

c. Taille du génome à encapsider

Dong *et al.* ont montré que la taille optimale du génome d'un AAV recombinant est comprise entre 4,1 et 4,9 kb, ce qui limite le transfert de gènes plus longs (Dong *et al.*, 1996). Les principaux inconvénients de l'utilisation de transgènes de grande taille sont le faible rendement de production de ces vecteurs (Dong *et al.*, 1996), et une faible infectiosité. La faible infectiosité des AAVr portant un génome plus grand est due à leur dégradation par le

protéasome après l'entrée dans la cellule : l'addition d'inhibiteur de protéasome permet de retrouver une transduction efficace (Grieger and Samulski, 2005). Les capsides contenant des génomes de grande taille seraient donc plus facilement reconnues et dégradées par le protéasome après leur entrée dans la cellule cible.

Comme approche alternative, le trans-épissage des vecteurs AAV a été développé (Nakai *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000). Cette approche consiste à diviser le transgène (jusqu'à 10kb maximum) en deux séquences, d'insérer sur l'une un site donneur d'épissage et sur l'autre un site accepteur d'épissage, puis de les encapsider chacune dans un vecteur AAV. Ces deux vecteurs sont ensuite co-administrés dans les cellules-cibles. La concatémérisation des deux génomes indépendants génère alors différents multimères (tête-tête, queue-queue, tête-queue,...). Seuls les concatémères tête-queue permettront la synthèse de l'ARN messenger fonctionnel, et donc l'expression de la protéine désirée. Cette stratégie a été utilisée pour faire exprimer le facteur VIII (hémophilie A), gène de 7 kb, dans un modèle de souris immunodéficiente (Chao *et al.*, 2002). Bien que cette approche soit prometteuse pour doubler la capacité d'encapsulation des AAVr, la principale limite semble être le manque d'efficacité de l'épissage (Lai *et al.*, 2005), responsable de la faible accumulation d'ARNm dans les cellules co-infectées.

d. Nouveaux tropismes cellulaires

Si l'isolement de nouveaux sérotypes a permis d'augmenter le nombre de types cellulaires transductibles par l'AAVr, il est peu probable qu'un sérotype naturel spécifique d'un seul type cellulaire émerge. C'est pourquoi la génération de mutants d'AAVr reste un axe de recherche important pour (figure 5A-D p.25) :

- cibler plus spécifiquement un tissu donné et ainsi limiter l'expression du produit du transgène dans les autres tissus.
- permettre la transduction d'un type cellulaire jusqu'alors peu ou pas transductible.

De plus, la génération de nouveaux variants d'AAVr pourraient permettre d'échapper à la neutralisation de la transduction par des anticorps anti-AAVr présents dans le sérum des individus à traiter (figure 5C-F p.25). Ce dernier point sera abordé dans le chapitre III-C-5-b de cette introduction.

Une stratégie consiste à produire un virion AAVr dont la capsid est composée d'un mélange de sous-unités VP issues de différents sérotypes. Selon la proportion des protéines de capsid VP de chaque sérotype, le virion « mosaïque » montrera soit un tropisme cellulaire combiné, soit dans certains cas un tropisme différent de chaque sérotype pris individuellement (figure 5A) (Hauck *et al.*, 2003; Rabinowitz *et al.*, 2004). Malgré les applications prometteuses de ces vecteurs mosaïques, cette approche soulève cependant deux problèmes :

- lors de la production à grande échelle de vecteur dont la capsid est composée de protéines VP de deux sérotypes différents, le ratio entre les deux sérotypes n'est pas toujours reproductible au moment de l'assemblage des capsides.
- une capsid mosaïque peut potentiellement être inactivée par des anticorps neutralisants dirigés contre l'un ou l'autre des sérotypes utilisés.

Une autre stratégie consiste à insérer dans la capsid des virions des molécules exogènes (peptide ou protéines ligands), de façon à cibler un type cellulaire spécifique (figure 5B)(Bartlett *et al.*, 1999; Gigout *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2003; Perabo *et al.*, 2003; Ponnazhagan *et al.*, 2002; Ried *et al.*, 2002; Stachler and Bartlett, 2006; Stachler *et al.*, 2008; Warrington *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2008). Cependant, la modification de la capsid AAV2 résulte souvent en une réduction significative du titre en particules, et du taux de transduction ; en particulier lorsqu'un ligand de grande taille est introduit dans la capsid. Pour palier à la faible infectiosité de ce type de mutants, Gigout *et al.* ont généré des vecteurs dont la capsid était composée d'un mélange de protéines VP sauvages et de protéines mutantes modifiées par un ligand (une IgG)(Gigout *et al.*, 2005). Un vecteur AAVr2 présentant une capsid portant le ligand ApoE dans la partie N-terminale de VP2 a permis des taux de transduction 220 et 4 fois plus importants des îlots de Langerhans du pancréas *ex vivo* et d'hépatocytes murin *in vivo* respectivement, comparé à l'AAVr2 (Loiler *et al.*, 2003).

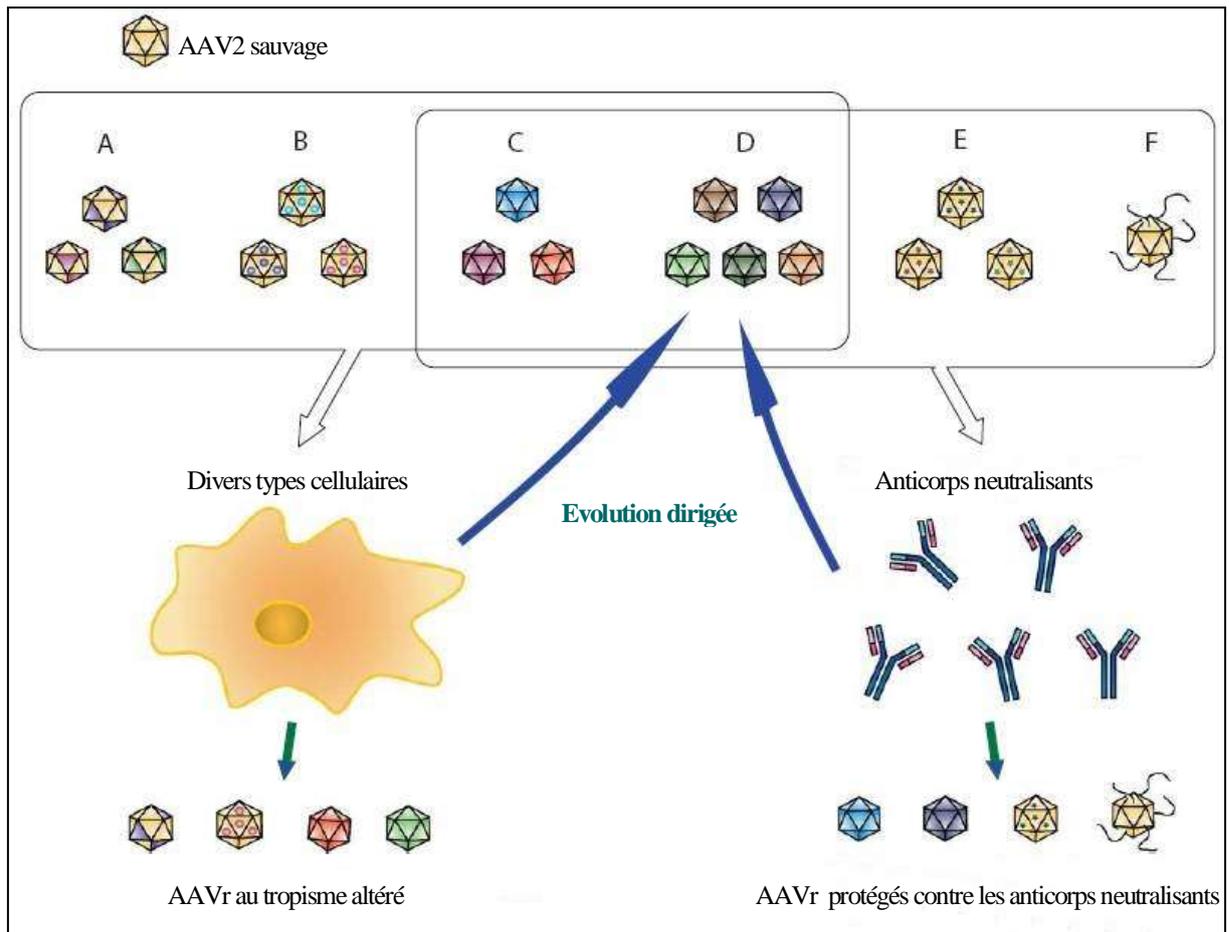


Figure 5 : Conception de nouveaux variants d'AAVr

D'après Kwon and Schaffer, 2008

Dans le but d'obtenir de nouveaux tropismes (A-D) ou pour contourner la présence d'anticorps neutralisants pré-existants (C-F).

A. Capsides mosaïques, composées de sous-unités de différents sérotypes.

B. Ligation de molécules exogènes aux protéines de la capside (anticorps, peptides) afin de cibler de nouveaux types cellulaires.

C. Pseudotypes : le génome de l'AAV2 est encapsidé dans une capside d'un autre sérotype.

D. Banque d'AAV et évolution dirigée afin de sélectionner des variants ayant diverses nouvelles propriétés.

E. Suppression des épitopes reconnus par les anticorps neutralisants pré-existants.

F. Conjugaison d'un polymère synthétique à la capside pouvant permettre au vecteur d'échapper aux anticorps neutralisants.

e. Les AAV recombinants double brin

La conversion de l'ADN simple brin (sb) du génome de l'AAVr en ADN double brin (db) dans le noyau de la cellule hôte est une étape limitante du transfert de gène à l'aide d'AAVr (Miao *et al.*, 2000). C'est pourquoi de nouveaux vecteurs véhiculant directement de l'ADN double brin ont été développés (Hirata and Russell, 2000; McCarty, 2008; McCarty *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003b). L'utilisation d'AAVr double brin (ou scAAV pour *self-complementary AAV*) permet d'éliminer cette étape de conversion.

Dans un AAVr conventionnel simple brin, la cassette d'expression est encadrée de deux ITR sauvages. Dans un AAVr double brin, un des ITR contient une délétion dans la séquence D, ou une mutation dans le site de résolution terminale (*trs*). Cette modification empêche le déroulement complet du cycle de réplication du génome de l'AAVr et aboutit à la formation d'un génome recombinant double brin de 2,3 kpb (Figure 6).

Ces vecteurs double brin permettent une expression du transgène plus rapide et plus importante *in vivo* dans de nombreux organes murins (foie, cerveau, muscle, rétine)(McCarty *et al.*, 2003; Natkunarajah *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003b). Dans des études récentes, l'efficacité de transduction entre des vecteurs AAVr sb et AAVr db a été étudiée dans le foie de primate non-humain : les AAVr7 et 8 db permettent ainsi un transfert de gène stable et une efficacité de transduction 20 à 120 fois plus élevée comparée aux AAVr traditionnels de même sérotype (Gao *et al.*, 2006; Nathwani *et al.*, 2006). De plus, de plus faibles doses de vecteur sont nécessaires pour atteindre des taux thérapeutiques de protéines circulantes lorsque que le transfert de gène est réalisé au moyen d'un AAVr db comparé à un AAVr sb (pour revue (McCarty, 2008)).

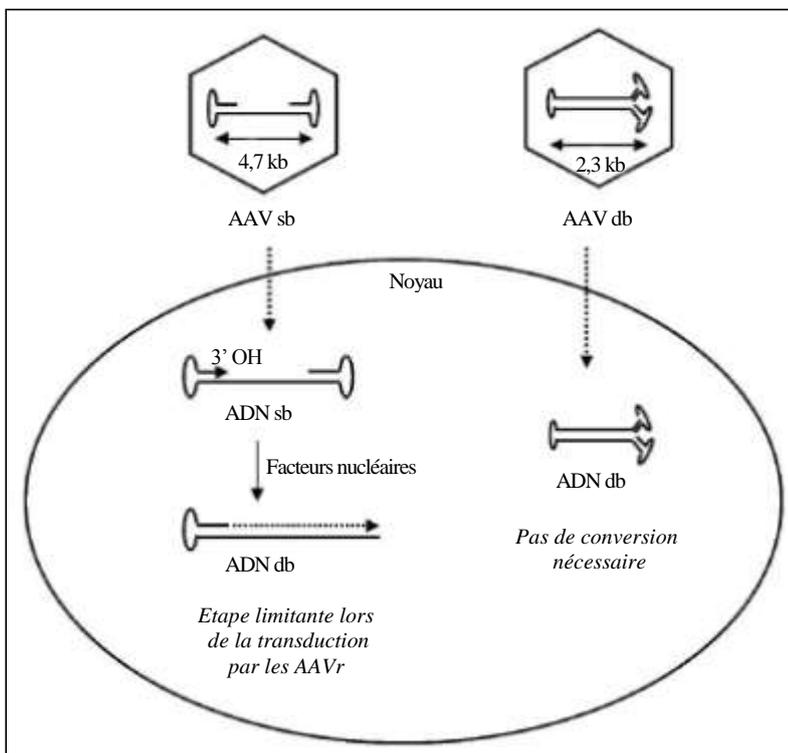


Figure 6 :

Comparaison entre un AAVr conventionnel et un AAVr double brin

D'après Le Bec and Douar, 2006. Le vecteur AAV double brin (db) porte une délétion dans la séquence D ou une mutation dans le site *trs* d'un des ITR (voir figure 2B p.15). La taille du génome viral du vecteur db est limitée à 2,3 kb, correspondant à la moitié du génome d'un vecteur AAV conventionnel (sb). L'utilisation de vecteurs db permet de s'affranchir de l'étape de conversion du génome viral, étape limitante dans le transfert de gène au moyen d'AAVr.

f. Immunogénicité

Les vecteurs AAV ne présentent qu'une faible immunogénicité, permettant, dans la plupart des cas, une persistance et une expression à long terme du transgène. Beaucoup de laboratoires suggèrent que cette faible immunogénicité est en partie due au fait que les vecteurs AAV ne sont pas capables de transduire efficacement les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et induisent une activation minimale de la réponse immunitaire innée, primordiale dans l'initiation d'une réponse immunitaire (Jooss *et al.*, 1998; Sarukhan *et al.*, 2001; Zaiss *et al.*, 2002). Cependant, ce dogme est aujourd'hui remis en cause : bien que la réponse immunitaire suite à l'injection d'AAVr soit faible, elle n'est pas inexistante, et peut même jouer un rôle critique dans le transfert de gène *in vivo*.

La relation entre AAVr et système immunitaire étant aujourd'hui un point primordial pour l'utilisation future de ces vecteurs en essais cliniques, une partie entière consacrée à ce sujet a été développée au chapitre III de cette introduction.

4. Essais cliniques utilisant l'AAVr

Les résultats encourageants obtenus après transfert de gène à l'aide d'AAVr dans un certain nombre de modèles animaux (Herzog *et al.*, 2001; Le Meur *et al.*, 2007; Nathwani *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2006) ont permis le développement d'essais cliniques. Depuis 1989, une cinquantaine d'essais cliniques ont été menés ou sont en cours de réalisation (tableau 3) (Carter, 2005; Mueller and Flotte, 2008; Warrington and Herzog, 2006). Ces protocoles cliniques concernent en majorité des maladies génétiques monogéniques, dont la plus représentée est la mucoviscidose. La majorité sont des essais de phase I, et utilisent principalement l'AAVr2 comme vecteur. En effet, bien que ce sérotype ne soit pas le plus efficace actuellement, il a été le premier sérotype étudié et est donc le mieux caractérisé. Sa production en conditions GMP (*Good Manufacturing Procedure*), compatible avec une administration chez l'homme, est mise au point.

Maladie	Transgène apporté	Sérotypage	Voie d'administration	Phase clinique	Statut
Maladies infectieuses					
Vaccin contre le VIH	Gag-PR-DeltaRT (tgAAC009)		intramusculaire	Phase I	En cours
Vaccin contre le VIH	Gag-PR-DeltaRT (tgAAC009)		intramusculaire	Phase I	Terminé
Cancer					
Cancer de la prostate	HSV-TK		intratumoral	Phase I/II	En cours
Maladies génétiques					
Déficit en lipoprotéine lipase	Lipoprotéine lipase (LPL)	AAVr1	intramusculaire	Phase I/II	En cours
Déficit en α 1-anitrypsine	α 1-anitrypsine	AAVr1	intramusculaire	Phase I	En cours
Déficit en α 1-anitrypsine	α 1-anitrypsine	AAVr2	intramusculaire	Phase I	Terminé
Maladie de Batten	CLN2	AAVr2	intracrânien	Phase I	En cours
Maladie de Canavan	aspartoacylase	AAVr2	intracrânien	Phase I	En cours
Mucoviscidose	CFTR	AAVr2	nasal	Phase I	Terminé
Mucoviscidose	CFTR	AAVr2	pulmonaire (aérosol)	Phase II	Terminé
Mucoviscidose	CFTR (tgAAVCF)	AAVr2	pulmonaire (aérosol)	Phase I	Terminé
Mucoviscidose	CFTR (tgAAVCF)	AAVr2	intrasinusal	Phase I/II	Terminé
Mucoviscidose	Phosphatase alcaline (hpAP)	AAVr6	intranasal	Phase I	En cours
Amaurose congénitale de Leber	RPE65	AAVr2	intraoculaire	Phase I	En cours
Amaurose congénitale de Leber	RPE65	AAVr2	intraoculaire	Phase I	En cours
Hémophilie B	minigène Facteur IX	AAVr2	intramusculaire	Phase I	Terminé
Hémophilie B	minigène Facteur IX	AAVr2	intra-artériel	Phase I	Terminé
Hémophilie B	minigène Facteur IX	AAVr2	intra-artériel	Phase I	En cours
Myopathie de Duchenne	mini-dystrophine	AAVr5	intramusculaire	Phase I	En cours
Myopathie des ceintures	Gamma sarcoglycan	AAVr2	intramusculaire	Phase I	En cours
Myopathie des ceintures	Gamma sarcoglycan	AAVr1	intramusculaire	Phase I	En cours
Maladies neurologiques					
Maladie de Parkinson	GAD65	AAVr2	intracérébral	Phase I	Terminé
Maladie de Parkinson	hAADC	AAVr2	intracérébral	Phase I	En cours
Maladie de Parkinson	neurturine (Cere-120)	AAVr2	intracrânien	Phase I	Terminé
Maladie de Parkinson	neurturine (Cere-120)	AAVr2	intracrânien	Phase II	En cours
Maladie de Parkinson	GAD65	AAVr2	intracérébral	Phase II	En cours
Maladie d'Alzheimer	facteur de croissance β -NGF	AAVr2	intracrânien	Phase I/II	Terminé
Epilepsie	neuropeptide Y (NPY)	AAVr1 et 2	intracrânien	Phase I	En cours
Maladies cardio-vasculaires					
Insuffisance cardiaque	SERCA2a	AAVr6	intracardiaque	Phase I	En cours
Insuffisance cardiaque	SERCA2a	AAVr1	intracardiaque	Phase I	En cours
Autres					
Arthrite rhumatoïde	TNFR:Fc (tgAAC94)	AAVr2	intra-articulaire	Phase I	Terminé
Arthrite rhumatoïde	TNFR:Fc (tgAAC94)	AAVr2	intra-articulaire	Phase I/II	En cours

Tableau 3 : Essais cliniques *in vivo* au moyen d'AAV recombinants depuis 1989

D'après www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical

III. AAVr et réponse immunitaire

A. Généralités

1. Le système immunitaire et infection virale

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient (le soi), et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger (le non soi) comme les agents infectieux auxquels il est exposé.

L'immunité met en jeu deux processus :

- l'immunité non spécifique, qui constitue l'immunité innée. Elle est d'action immédiate, et fait intervenir les cellules phagocytaires. Elle est indépendante de la nature de l'antigène étranger rencontré.
- l'immunité spécifique, qui confère l'immunité adaptative ou immunité acquise. Elle se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de l'antigène étranger. Une mémoire immunitaire, caractéristique de l'immunité adaptative, se met alors en place.

Etant donné que les réponses immunitaires adaptatives en primo-infection nécessitent un délai de 4-5 jours pour être efficaces, l'immunité innée apporte la première ligne de défense.

a. L'immunité innée

La réponse immunitaire non spécifique ou innée passe principalement par l'inflammation, qui est la première barrière que rencontrent les pathogènes ayant franchi l'enveloppe corporelle de l'hôte. Ce type de réponse immunitaire ne dépend pas de la nature de l'agent qu'il combat. Le but de l'inflammation est d'inactiver le pathogène et de mettre en œuvre la réparation des tissus (en cas de lésions). Les principales étapes de l'inflammation sont la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des capillaires de la zone atteinte afin de faciliter l'arrivée des cellules inflammatoires. Puis s'ensuit l'élimination des pathogènes par des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires, cellules NK).

Le système immunitaire inné est constitué de médiateurs et de cellules de l'inflammation qui jouent un rôle clé dans la reconnaissance et la réponse précoce contre les agents infectieux. La reconnaissance des virus, incluant les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique, par les cellules inflammatoires comme les macrophages et les cellules dendritiques conduit à la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, qui renforcent le traitement des antigènes et la présentation des épitopes viraux sur les molécules du CMH. L'expression de gènes de l'inflammation active l'expression de molécules de costimulation à la surface des CPA. Les CPA peuvent alors à leur tour activer les populations lymphocytaires T et B.

Les cellules de l'immunité innée reconnaissent les antigènes étrangers par l'intermédiaire de récepteurs extra- et intracellulaires. Ces récepteurs regroupent les TLR (pour *toll-like*

receptors), les protéines antivirales cytoplasmiques (RIG-1 et MDA5) et les NLR (pour *NOD-like receptor*), qui sont spécialisés dans la reconnaissance des antigènes microbiens et viraux (Meylan and Tschopp, 2006; Meylan *et al.*, 2006). Une fois activés, les récepteurs régulent les voies interféron (IFN) de type I et du facteur nucléaire NFκB, ou activent les pro-cytokines en leur forme active, comme l'interleukine 1 (IL1). Les IFN sont des glycoprotéines qui inhibent la réplication des virus à l'intérieur des cellules infectées. Une fois sécrétés, ces interférons diffusent dans les tissus. Ils stimulent alors la synthèse et l'expression des molécules du CMH de classe I, ce qui favorise la présentation des peptides viraux. Ils stimulent également l'activation de cellules inflammatoires non spécifiques telles que les cellules NK (*Natural Killer*).

L'antigène étranger peut aussi parfois activer lui-même le système du complément de manière non spécifique. Le complément comprend une vingtaine de protéines qui agissent en cascade et permettent d'éliminer directement le pathogène. Le système du complément peut aussi être activé par la réponse immunitaire spécifique.

b. L'immunité adaptative et ses acteurs

Les acteurs principaux de l'immunité spécifique ou adaptative sont les lymphocytes (T et B) et les cellules présentatrices d'antigènes. Chaque lymphocyte porte un récepteur membranaire lui permettant d'identifier un motif chimique unique. Le motif de l'antigène reconnu par le récepteur est appelé épitope.

Les lymphocytes B (LB)

Les LB se développent dans la moelle osseuse et mûrissent dans les organes lymphoïdes secondaires. Le récepteur des LB est une immunoglobuline (Ig) membranaire, capable de reconnaître un seul épitope. Ce récepteur est nommé BCR pour *B-cell Receptor*. Les lymphocytes B expriment également à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ainsi que des molécules du CMH de classe II, ce qui en fait des cellules présentatrices d'antigènes. Ils possèdent également des récepteurs CR (*complement receptor*) pour le fragment C3 du complément, et des récepteurs pour le fragment Fc des IgG. Une fois stimulés, les LB se multiplient et sécrètent des anticorps qui vont être capables de se lier spécifiquement à l'antigène reconnu. Ils sont responsables de la réponse immunitaire humorale (production d'anticorps) (Larosa and Orange, 2008).

Les lymphocytes T (LT)

Les LT sont maturés dans le thymus et représentent chez l'homme plus de 80 % des lymphocytes en circulation dans le sang. Le récepteur des LT est le TCR (pour *T-cell receptor*) qui comporte la molécule CD3. Il ne reconnaît que des antigènes peptidiques. Pour être reconnue par un LT, une protéine étrangère doit être digérée en peptides qui devront ensuite être associés à des molécules du CMH. Le TCR reconnaît alors le complexe CMH/peptide (Larosa and Orange, 2008).

Deux grands types de LT existent : les LT effecteurs et les LT régulateurs. Les LT effecteurs sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative, alors que les LT régulateurs sont impliqués dans le processus de tolérance immunitaire.

On distingue deux populations principales de lymphocytes T effecteurs selon la présence de protéines membranaires spécifiques (Larosa and Orange, 2008) :

- les lymphocytes T $CD8^+$: ce sont les lymphocytes T cytotoxiques (LTc). Ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule du CMH de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par la cellule. Une fois activés, les LTc éliminent directement les cellules infectées. Ils provoquent des lésions membranaires sur la cellule présentant l'antigène étranger en libérant des molécules cytotoxiques contenues dans les granules lytiques : les granzymes et la perforine. La perforine agit en formant des pores dans la membrane de la cellule infectée laissant entrer les granzymes dans le cytoplasme cellulaire. Ces granzymes induisent l'apoptose des cellules infectées.

- les lymphocytes T $CD4^+$: ce sont les lymphocytes T auxiliaires ou helper (LTh). Ces lymphocytes reconnaissent un antigène présenté sur une molécule du CMH de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par des cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont pour rôle d'activer des cellules du système immunitaire (principalement par la production de cytokines) : les macrophages, les LB mais aussi les LTc. Classiquement, les LTh se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2 selon l'environnement cytokinique dans lequel ils se trouvent et les signaux qu'ils reçoivent : les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (LTc), les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps par les LB).

Les LT mémoires se développent une fois que l'infection primaire est contrôlée, et agissent en tant que sentinelles du système immunitaire, capables de purger rapidement l'hôte de nouvelles infections par le même agent pathogène. A l'inverse des LT naïfs, les LT mémoires

n'ont pas besoin d'être de nouveau activés par une CPA. Il suffit qu'ils rencontrent l'antigène pour se réactiver, cette interaction induisant la prolifération rapide de LT cytotoxiques.

Les LT régulateurs ont une activité suppressives et sont les acteurs principaux de la tolérance. Ces cellules sont $CD3^+ CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD127^-$.

L'activation d'un LT naïf en T effecteur nécessite plusieurs signaux (figure 7) (Vincenti, 2008).

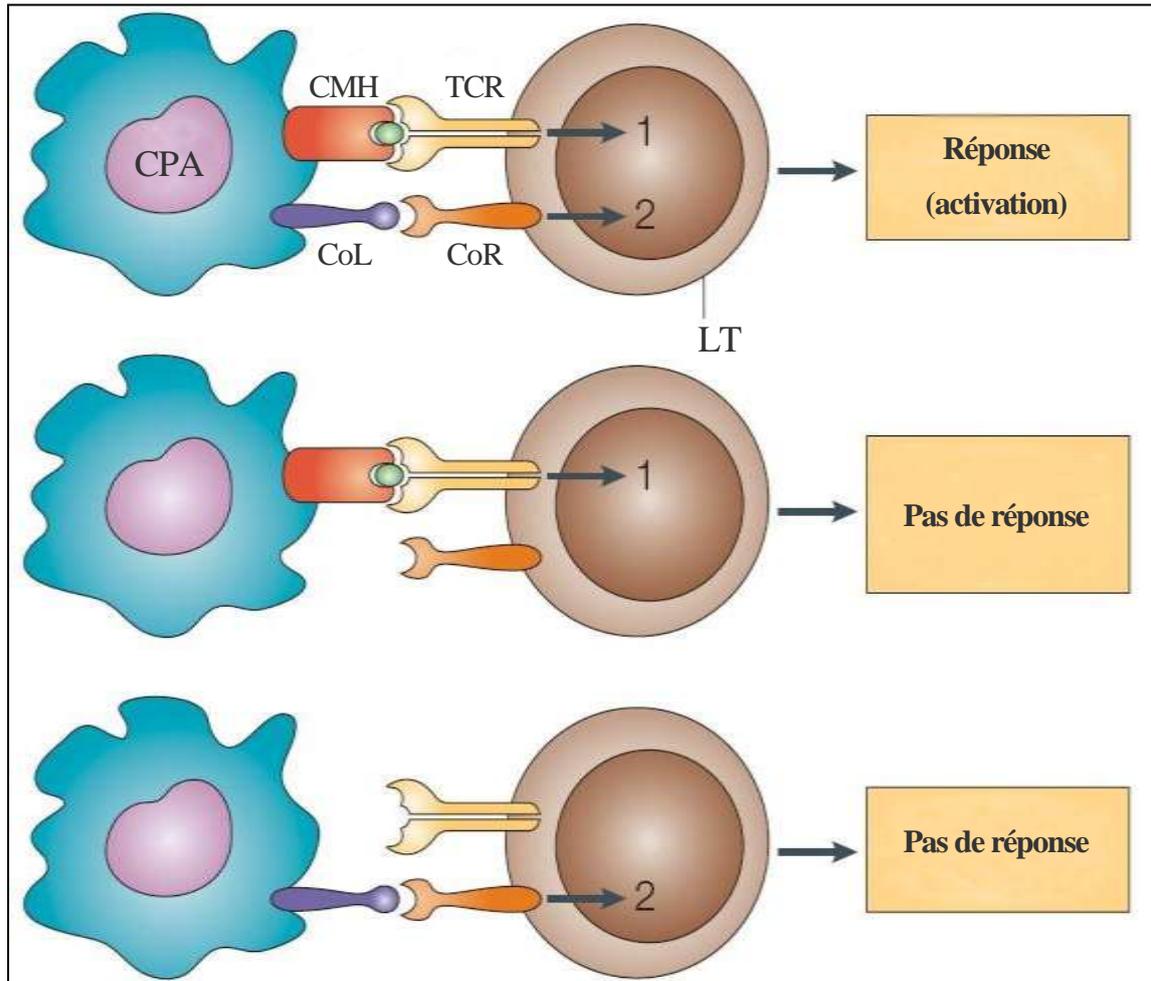


Figure 7 : Activation d'un lymphocyte T

D'après Chen et al, 2004. Deux signaux (1 et 2) sont nécessaires pour activer un lymphocyte T. Le premier, antigène-spécifique, met en jeu l'interaction entre le complexe CMH/antigène de la CPA avec le TCR du LT. Le second, signal de costimulation, est apporté par la fixation de co-récepteurs (CoR) à leur ligand (CoL), comme par exemple CD28 et son ligand B7-1 ou B7-2. L'absence d'un des 2 signaux engendre un lymphocyte T non réactif, anergique ou ignorant.

Le premier signal est antigène-spécifique et dépend de l'interaction des molécules du CMH présentant l'antigène à la surface d'une CPA avec le TCR du lymphocyte T. Le second signal, ou signal de costimulation n'est pas antigène-spécifique. Il résulte de l'interaction entre des récepteurs spécifiques à la surface du LT et leur ligand sur les CPA. Ces 2 signaux,

indispensables à l'activation des LT, activent 3 voies de cascades intra-cellulaires: la voie de la calcineurine (une phosphatase calcium-dépendante), la voie des MAP-kinases (pour *mitogen-activated protein kinase*), et la voie du NFκB (Halloran, 2004). Ces voies déclenchent alors la production de nombreuses molécules, dont l'interleukine-2 et la chaîne α de son récepteur CD25, et CD40 ligand. L'interleukine-2 en se liant à son récepteur active un troisième signal qui induit la prolifération des lymphocytes, engendrant de nombreux lymphocytes T effecteurs.

Sans le signal de costimulation (signal 2), les lymphocytes deviennent anergiques et entrent en apoptose (Snanoudj *et al.*, 2006). De nombreuses voies de costimulation jouent un rôle dans la régulation des LT, soit en activant soit en inhibant leur activation (figures 8 et 9) (McAdam *et al.*, 1998). La voie la plus importante et la mieux caractérisée est l'interaction B7/CD28. Une autre voie, l'interaction CD40/CD40L a également été bien étudiée.

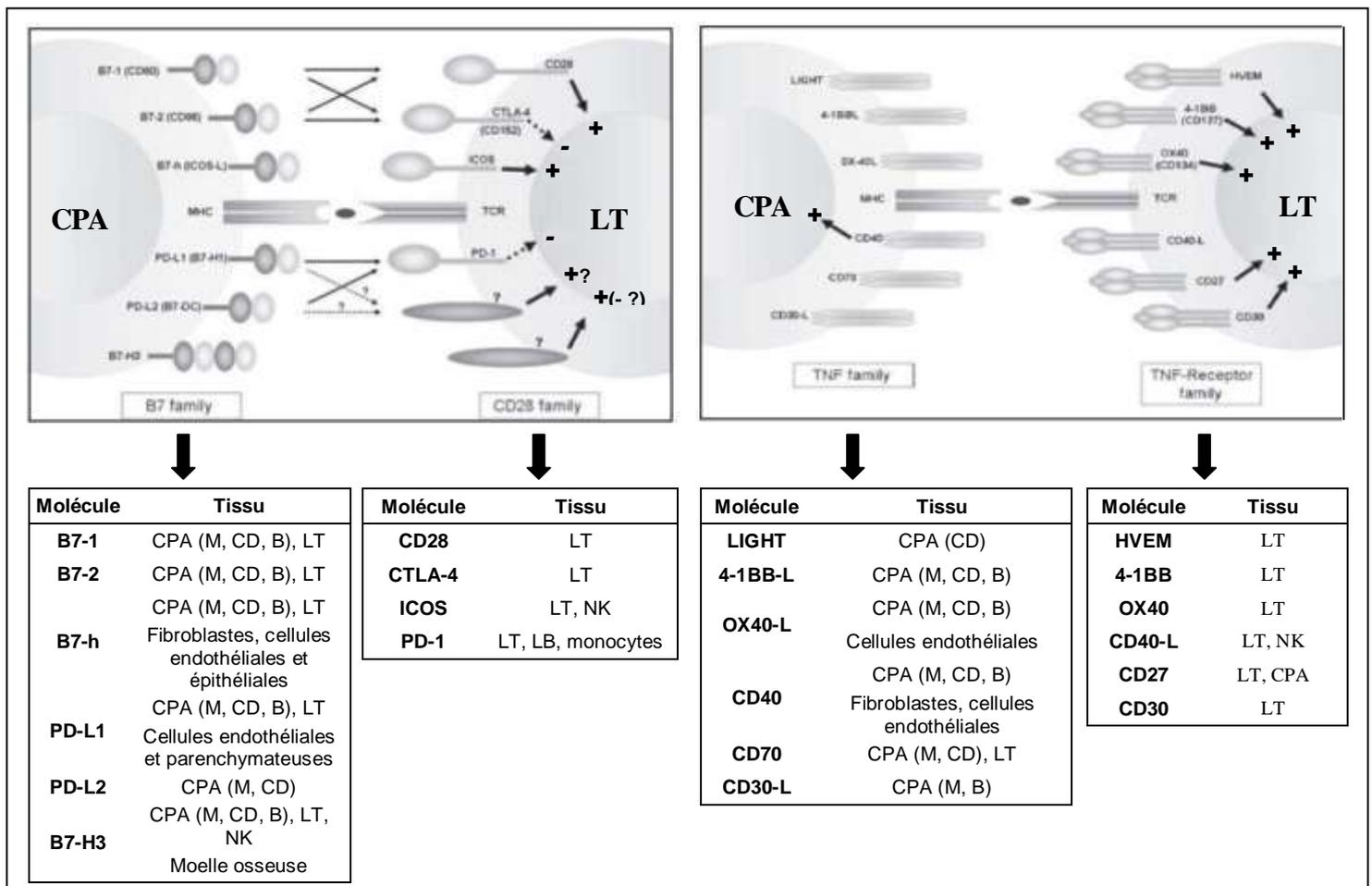


Figure 8 : Les différents signaux de costimulation et leur effet

D'après Snanoudj *et al.*, 2006. CPA, cellule présentatrice d'antigènes ; M, monocyte ; CD, cellule dendritique ; B, lymphocyte B ; LT, lymphocyte T ; NK, cellules NK ; +, activation ; -, inhibition.

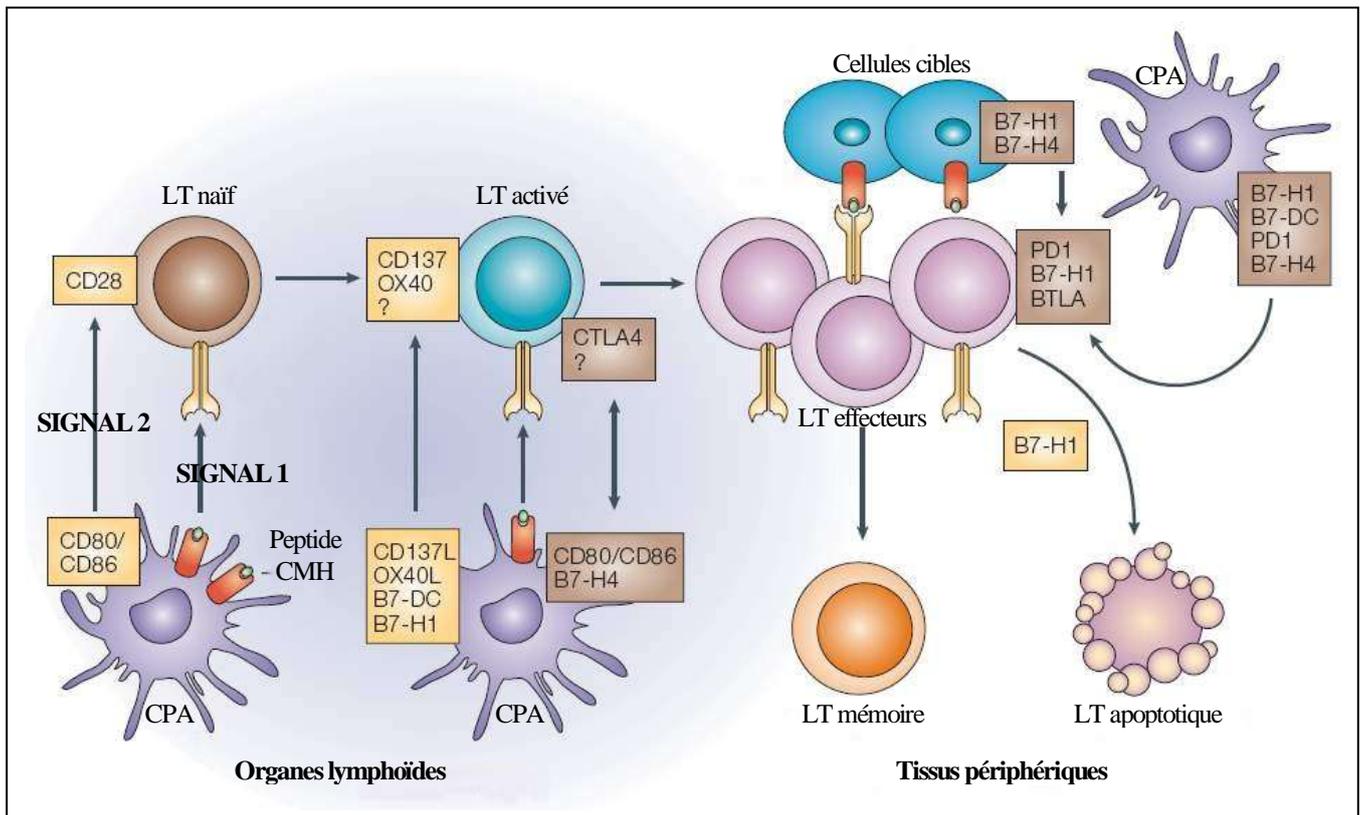


Figure 9 : Représentation schématique du réseau de costimulation des lymphocytes T

D'après Chen *et al.*, 2004. Les co-stimulateurs (en jaune) et les co-inhibiteurs (en marron) agissent sur une ou plusieurs étapes de l'activation des lymphocytes T, dont l'activation, la différenciation, la maturation et potentiellement la réponse mémoire. Les LT naïfs des organes lymphoïdes expriment constitutivement la molécule CD28 à leur surface. Après liaison à leur ligand (CD80 ou CD86), la première étape d'activation intervient. Une série d'interactions avec des co-stimulateurs ou des co-inhibiteurs permettent ensuite la différenciation et la maturation des LT activés en LT effecteurs. Après migration dans les tissus périphériques, les LT effecteurs sont encore sujets à des régulations par les signaux de co-stimulation ou co-inhibition assurés par les CPA et les cellules de l'hôte. LT, lymphocyte T ; CPA, cellule présentatrice d'antigènes.

Les ligands de CD28 sont B7-1 (ou CD80) et B7-2 (ou CD86). L'interaction du CD28 avec un de ses ligands (ou signal 2) active la production d'IL-2, signal de survie des LT, prévenant ainsi l'apoptose ou l'anergie induite par le signal 1 seul (interaction du TCR avec le complexe antigène/CMH). Cette interaction favorise donc la différenciation T vers les cellules de phénotype Th1, et stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B ainsi que la prolifération des lymphocytes T activés (Alegre *et al.*, 2001). Après activation des lymphocytes T par la fixation de CD28 à B7, un second récepteur, CTLA4 est alors exprimé à la surface des LT. CTLA4 est structurellement homologue à CD28 avec une affinité 20 fois plus forte pour leurs ligands B7-1 et B7-2. Ainsi, CTLA4 entre en compétition avec CD28 pour se lier aux molécules B7. Contrairement à CD28, CTLA4 émet un signal inhibiteur.

CTLA4 inhibe l'activation du LT (Chen, 2004; Vincenti, 2008). Quelques mécanismes sont actuellement décrits. Au niveau du LT, la fixation du CTLA4 aux récepteurs B7 inhibe l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT, arrêtant la transcription du gène de l'IL2. Cela inhibe également directement la production des cyclines D3 et cdk4. De plus, la dégradation de l'inhibiteur de cycle cellulaire p27^{kip} est altérée (Brunner *et al.*, 1999) et la transcription médiée par AP-1 et NF-κB est fortement diminuée (Fraser *et al.*, 1999). Au niveau des LT CD4⁺ pré-activés, la fixation du CTLA4 aux B7 entraîne la mort cellulaire par un mécanisme indépendant de Fas (Scheipers and Reiser, 1998). En ce qui concerne la CPA, la fixation de CTLA4 à B7 induit la production d'IFN-γ par les cellules dendritiques (CD), qui par action autocrine ou paracrine stimule l'enzyme indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), activant le catabolisme du tryptophane. IDO catalyse la réaction de dégradation du tryptophane en kynurénine. Ce produit de dégradation ainsi que la diminution du tryptophane disponible localement inhibe la prolifération des LT et induit leur apoptose dans l'environnement immédiat (Grohmann *et al.*, 2002). La molécule B7 étant présente uniquement à la surface des CD, macrophages, LB, cellules NK, et LT activés, sa fixation au CTLA4 n'entraîne l'augmentation de la production d'IDO que dans ces cellules (Boasso *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que la présence des récepteurs B7-1 et B7-2 était nécessaire pour l'activité suppressive des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Graca *et al.*, 2002).

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)

Pratiquement toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment les molécules du CMH-I et sont donc aptes à présenter des antigènes aux LT cytotoxiques. Mais ce ne sont pas, au sens strict, des cellules présentatrices d'antigènes.

Les cellules présentatrices d'antigènes sont des cellules diverses qui ont en commun la faculté d'exprimer les molécules du CMH de classe II à leur surface. Ces cellules ont la capacité d'endocyter les antigènes protéiques exogènes, de les découper en peptides, et de les associer aux molécules du CMH-II. L'ensemble migre alors vers la membrane cellulaire pour être présenté aux LT auxiliaires.

Les principales cellules présentatrices d'antigènes sont :

- le système des phagocytes mononucléés, comprenant les monocytes et les macrophages.
- les lymphocytes B.

- les cellules dendritiques présentes essentiellement dans les zones T des tissus lymphoïdes.
- les cellules dendritiques folliculaires des ganglions lymphatiques et de la rate. Elles possèdent des récepteurs pour le fragment Fc des IgG ou pour le fragment C3 du complément. Grâce à ces récepteurs, elles peuvent fixer les complexes immuns antigène-anticorps et présenter l'antigène aux LB, renforçant ainsi la production d'anticorps et la pérennisant.
- des cellules endothéliales ou épithéliales qui, après stimulation par l'interféron- γ expriment les molécules CMH-II à leur surface.

Les CD sont les CPA les plus puissantes. Comme les LT, les CD peuvent être impliquées aussi bien dans l'immunité adaptative que dans la tolérance immunitaire.

La présentation de l'antigène étranger est indispensable pour déclencher la plupart des réponses immunitaires adaptatives.

Classiquement, les antigènes peuvent être présentés par 2 voies selon leur nature (Trombetta and Mellman, 2005):

- les antigènes endogènes générés par la machinerie cellulaire prennent la voie classique de présentation directe sur les molécules de CMH-I, dont les mécanismes ont été très bien caractérisés. Cette présentation induit l'activation des LT CD8+.
- les antigènes exogènes sont présentés sur les molécules de CMH-II par les CPA, après avoir été endocytés et découpés en peptides, induisant l'activation des LT CD4+ et des LB.

Cela signifie que toutes les cellules nucléées infectées par un virus présentent des antigènes viraux à leur surface. Les CPA peuvent elles présenter les peptides viraux à leur surface soit sur le CMH-I (lorsqu'elles sont infectées), soit sur le CMH-II (par capture de peptides viraux ou de virions n'ayant pas encore infecté de cellule).

2. AAVr et réponse immunitaire

Une des caractéristiques de l'AAVr qui a fait de lui un vecteur émergent dans le domaine de la thérapie génique est sa capacité à maintenir à long terme l'expression d'une protéine étrangère. Les premières expériences de transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr, menées

dans le muscle squelettique de souris, ont montré que l'AAVr permettait de faire exprimer à long terme divers transgènes immunogènes (Bohl *et al.*, 1998; Herzog *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 1996). Ces résultats ont donc été appliqués à d'autres organes cible avec divers transgènes. Ainsi, plusieurs modèles animaux de pathologies génétiques ont pu être traités à l'aide de vecteurs AAV (Acland *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006b; Le Meur *et al.*, 2007; Mas *et al.*, 2006; Mount *et al.*, 2002), annonçant le début des essais cliniques de thérapie génique au moyen de l'AAVr chez l'homme.

Contrairement à d'autres vecteurs viraux, l'AAVr a longtemps été décrit comme un vecteur faiblement immunogène, caractéristique qui était attribuée à (i) sa faible capacité à activer l'immunité innée, primordiale dans l'initiation de la réponse immunitaire, (ii) et à sa faible efficacité à transduire les CPA (Jooss *et al.*, 1998; Sarukhan *et al.*, 2001; Zaiss *et al.*, 2002). Cette faible immunogénicité des vecteurs AAV est de plus en plus remise en cause aujourd'hui, particulièrement dans les modèles grands animaux où de nombreux cas de développement de réponse immunitaire suite au transfert de gène sont décrits. Cependant, comparés à d'autres vecteurs viraux comme ceux dérivés des adénovirus, les vecteurs AAVr restent moins immunogènes.

L'activation et la nature de ces réponses immunitaires dépendent de nombreux facteurs : la voie d'administration du vecteur, la cinétique d'expression du transgène, la dose de vecteur administrée, le sérotype ou pseudotype utilisé, sa capacité ou non à transduire les cellules présentatrices d'antigènes, l'organe-cible, l'espèce hôte, la nature du produit du transgène utilisé, ainsi que le statut immunitaire préalable de l'hôte (Vandenberghe and Wilson, 2007).

Il existe différentes sources d'antigène et différentes façons de le présenter, induisant différents types de réponse immunitaire, comme décrit au paragraphe précédent. La figure 10 tente de présenter toutes les voies qui pourraient avoir lieu suite à un transfert de gène au moyen d'un vecteur AAV (Vandenberghe *et al.*, 2006).

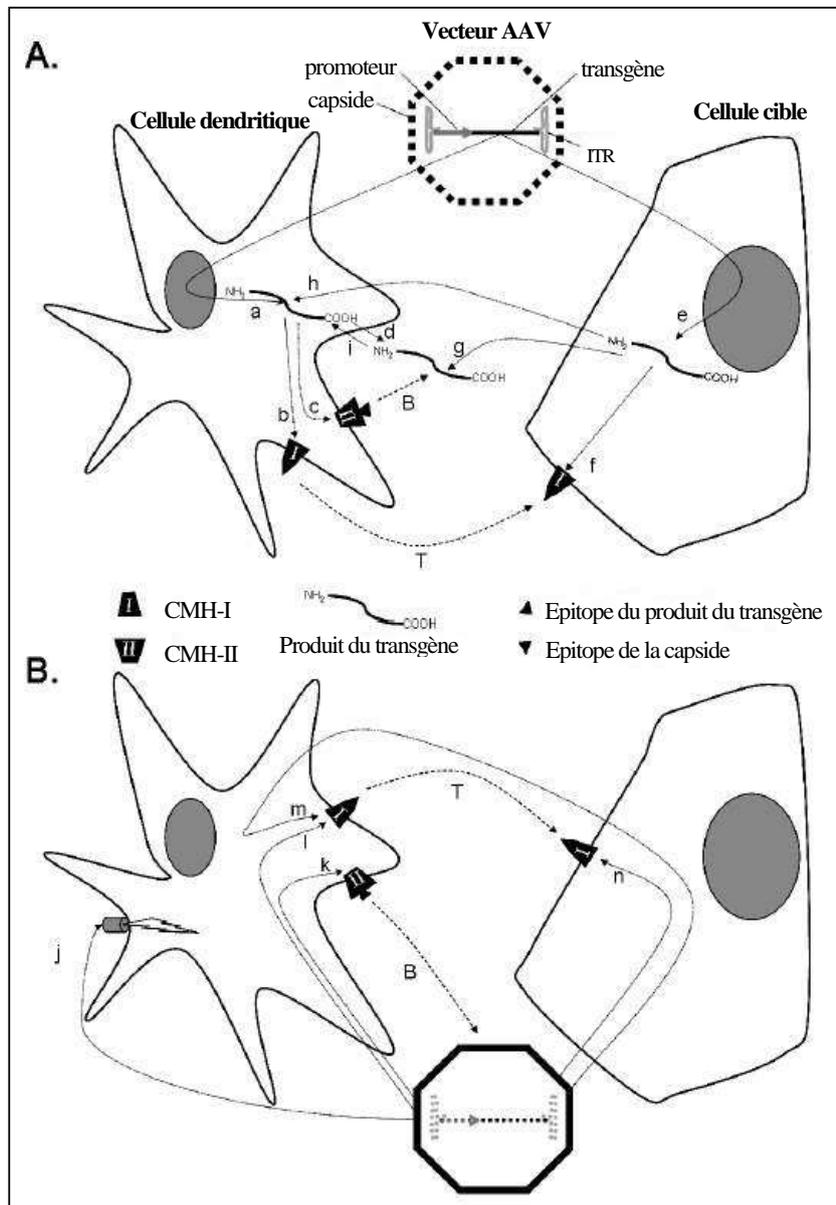


Figure 10 : Représentation des différentes interactions entre AAVr, CD et cellule-cible

D'après Vandenberghe *et al.*, 2007. Le schéma du vecteur AAV représente la particule virale ainsi que ses composants : capsid, ITR, promoteur et transgène. Les lignes continues indiquent les sources potentielles d'antigènes.

A. Différentes voies possibles de présentation des antigènes issus du produit du transgène. a/ Transduction directe des CD par l'AAVr induisant l'expression du produit du transgène. b/ Présentation de peptides intracellulaires sur le CMH-I, présentation de peptides sur le CMH-II. c/ Chargement de peptides sur le CMH-II. d/ Exocytose du produit du transgène. e/ Transduction de la cellule-cible, conduisant à l'expression du produit du transgène. f/ Présentation directe d'épitope du produit du transgène sur le CMH-I. g/ Exocytose du produit du transgène. h/ Capture du produit du transgène intracellulaire par la CD. i/ Capture du produit du transgène extracellulaire par la CD.

B. Différentes voies possibles de présentation des antigènes issus de la capsid de vecteur AAV. j/ Activation intra- ou extracellulaire des TLR par la capsid (ou autre composant du vecteur). k/ Présentation d'épitope de la capsid sur le CMH-II par la voie exogène classique. l/ Présentation d'épitope de la capsid sur le CMH-I des CD par cross-présentation. m/ Cross-présentation de la capsid sur le CMH-I après phagocytose de la cellule transduite. n/ Cross-présentation de la capsid par la cellule-cible.

B : signal d'activation des LB par le produit du transgène. T : signal d'élimination des cellules-cibles portant des épitopes sur le CMH-I par les LTc.

Les cellules transduites par le vecteur AAV peuvent présenter les antigènes du produit du transgène (source endogène) par la voie classique de présentation directe sur les molécules de CMH-I (Figure 10a, b, e, f)

La présentation classique des antigènes exogènes (produit du transgène ou capsid AAVr) par les CPA a lieu sur les molécules de CMH-II (figure 10c, h, i, k) induisant l'activation des LT CD4⁺ et des LB (Trombetta and Mellman, 2005)

Une autre voie de présentation, nommée cross-présentation, pourrait être impliquée suite à une administration d'AAVr. Cette voie permet de présenter un antigène exogène sur une molécule de CMH-I. Elle est peu caractérisée à l'heure actuelle et serait précédée par un mécanisme endosomal de prise en charge de l'antigène (figure 10b, h, i, m, n). La cross-présentation est considérée comme le mécanisme prépondérant par lequel un produit du transgène déclenche la réponse immunitaire T CD8⁺ (Jooss *et al.*, 1998; Manning *et al.*, 1997; Sarukhan *et al.*, 2001).

Suite à un transfert de gène à l'aide d'un AAVr, deux grands types de réponses immunitaires adaptatives peuvent être déclenchés : les réponses dirigées contre les protéines de la capsid du vecteur, et les réponses dirigées contre le produit du transgène lui-même. Il existe une différence majeure entre ces 2 sources d'antigène : la capsid est reconnue par l'hôte comme protéine exogène et n'est pas renouvelée suite à son administration, alors que le produit du transgène est synthétisé de manière endogène par les cellules de l'hôte et cela de façon renouvelée.

La capsid est le premier point d'interaction entre l'hôte et le vecteur, et détermine le tropisme et le profil d'expression du transgène. De plus, c'est l'un des deux composants physiques de la particule virale qui influe sur l'immunité innée et de ce fait conditionne les réponses pro-inflammatoires précoces (figure 10 j). Le produit du transgène, tributaire de l'efficacité de la transduction, influe plus tard sur le système immunitaire de l'hôte. Le début de l'expression du transgène par la machinerie des cellules transduites est en effet nécessaire avant tout développement de réponse immune à son encontre.

B. La réponse immunitaire innée contre les vecteurs AAVr

Après transduction d'une cellule par un AAVr, il semblerait que les TLR ne soient pas impliqués dans la modulation de la réponse immune après transfert de gène à l'aide d'AAVr,

(Cao and Herzog, 2008; Hensley and Amalfitano, 2007), et que l'AAVr n'induit pas de réponse IFN suite à son administration (Rautsi *et al.*, 2007).

Il existe d'autres mécanismes de réponse innée antivirale qui peuvent moduler la biologie des virus et des vecteurs viraux. Récemment, APOBEC3A a été identifié comme un puissant inhibiteur de la réplication de l'AAV (Chen *et al.*, 2006). *In vitro*, les macrophages sont activés par les AAVr et jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réponse innée induite par l'AAVr chez la souris (Zaiss *et al.*, 2002). Toutefois, malgré l'interaction macrophages/AAVr, ces cellules sont faiblement transduites par l'AAVr *in vitro* (Zaiss *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible que les macrophages et cellules dendritiques qui expriment APOBEC3A soient peu transductibles par l'AAVr, alors que la transduction par un AAVr de cellules n'exprimant pas APOBEC3A n'est pas altérée (Chen *et al.*, 2006).

L'interaction des cellules de l'immunité innée avec les vecteurs viraux nécessite et/ou est modulée par des opsonines présentes dans le sérum. Des études récentes ont montré que l'adhésion de l'AAVr sur les macrophages et l'activation de l'expression de gènes inflammatoires sont améliorés en présence de sérum (Zaiss *et al.*, 2008). De plus, le sérum perd son action s'il est inactivé par la chaleur ou déplété de la fraction C3 du complément, ce qui montre que l'AAVr interagit avec le complément. Des expériences d'immunoprécipitations ont mis en évidence la liaison du fragment iC3b du complément à la capsid AAVr2. Ainsi, l'AAVr2 n'active pas la réaction en cascade du complément et n'est pas un cofacteur de la réaction de dégradation du fragment C3b en iC3b. Cependant, les cellules infectées opsonisées avec le fragment iC3b du complément sont tout de même sujettes à l'adhésion et à la phagocytose du fait de leur reconnaissance par les récepteurs du complément à la surface des cellules immunitaires (Zaiss *et al.*, 2008).

D'autre part, il a été montré que le complément peut moduler la réponse cellulaire T par l'interaction directe avec le LT, et indirectement par son action sur les CPA. En effet, l'interaction avec le récepteur au complément sur les CPA module leur état de maturation et leur profil d'expression de cytokines, ce qui au final influence la réponse cellulaire T induite pendant la présentation de l'antigène (Kemper and Atkinson, 2007). Ainsi, l'opsonisation des cellules transduites par iC3b et le facteur H inhibe l'activation du complément et crée un environnement relativement non inflammatoire, qui peut être en partie responsable de l'inefficacité de l'AAVr à induire la maturation des CD.

In vivo, des souris déficientes pour le récepteur 1 et 2 du complément ou pour la fraction C3 présentent une altération de l'immunité humorale contre le vecteur AAVr2, avec une

production en anticorps neutralisants significativement diminuée. Ces résultats montrent que le système du complément est un élément essentiel de la réponse immunitaire contre l'AAVr (Zaiss *et al.*, 2008). En effet, l'interaction du récepteur du complément avec les récepteurs des antigènes des LB favorise la réponse B par une forte diminution du seuil d'activation des LB, induisant ainsi une production accrue d'anticorps (Carroll, 2004).

Cependant, la plupart des travaux sur l'activation de l'immunité innée ont été faits avec l'AAVr de sérotype 2 (Zaiss and Muruve, 2005). D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer le potentiel pro-inflammatoire des autres sérotypes, ainsi que leur affinité aux TLR et autres cofacteurs modulant la réponse immunitaire innée.

C. La réponse immunitaire adaptative contre les vecteurs AAVr

1. Réponse humorale

Une infection naturelle par un AAV sauvage initie une réponse humorale dirigée spécifiquement contre la capsid virale et caractérisée par la production d'anticorps neutralisants. 30 à 80% de la population humaine est séropositive pour l'AAV de sérotype 2, et ces anticorps sont neutralisants chez 20 à 67% de la population (Erles *et al.*, 1999). Des pourcentages semblables existent pour les autres sérotypes d'origine humaine, comme pour ceux d'origine simienne qui présentent un fort taux d'homologie au niveau de leur séquence (Gao *et al.*, 2004b).

Les anticorps neutralisants sont la première défense d'un hôte contre une infection virale, et de nombreuses études ont montré que la présence d'anticorps neutralisants pré-existants peut diminuer voire totalement inhiber l'efficacité d'un transfert de gène au moyen d'un AAVr (Peden *et al.*, 2004; Scallan *et al.*, 2006; Zaiss and Muruve, 2005).

Chez le primate non-humain, hôte naturel du virus AAV8, un faible titre en anticorps neutralisants anti-AAV8 (1:5) a suffi pour inhiber totalement l'expression du transgène après une injection d'AAVr8-FIX par l'artère hépatique et aucune séquence ADN du transgène n'a été retrouvée dans les tissus analysés. Au contraire, les tissus des animaux ayant des taux d'anticorps neutralisants indétectables ont été transduits efficacement (Jiang *et al.*, 2006a).

Les mêmes observations ont été faites chez l'homme lors d'un essai clinique visant à traiter l'hémophilie B par transfert de gène à l'aide d'un AAV2-FIX dans le foie (Manno *et al.*,

2006) : un taux d'anticorps anti-AAV2 de 1:17 chez un des patients a été suffisant pour inhiber la transduction, et empêcher toute expression de facteur IX (FIX).

L'exposition naturelle de l'homme aux AAV est donc un obstacle majeur pour le succès des applications cliniques de thérapie génique à l'aide de vecteurs AAV.

L'administration d'un AAV recombinant, comme l'infection naturelle par l'AAV sauvage, induit également une réponse humorale dirigée contre la capsid, limitant l'efficacité de transduction lors de la réadministration d'un second vecteur AAV de même sérotype (Halbert *et al.*, 2000; Limberis and Wilson, 2006; Manning *et al.*, 1998; Riviere *et al.*, 2006).

2. Réponse cellulaire

Plusieurs études précliniques ont montré que le vecteur AAV2 permet d'obtenir une expression à long terme du produit du transgène chez des animaux immunocompétents (souris, rat, chien, primate) sans déclencher de réponse immunitaire cellulaire adaptative (Mingozzi *et al.*, 2003; Mount *et al.*, 2002; Nathwani *et al.*, 2002; Snyder, 1999). Au vu de ces résultats précliniques encourageants, un essai clinique de phase I/II a été lancé pour tenter de traiter l'hémophilie B : un AAVr2 codant le facteur IX humain sous le contrôle d'un promoteur foie-spécifique a été administré à 7 patients par l'artère hépatique (Manno *et al.*, 2006).

Cependant, dans cet essai clinique, la perte d'expression du FIX chez 2 patients a été associée à une réponse cellulaire dirigée contre la capsid AAV2. Le premier patient de cette étude ayant reçu la dose prévue d'AAVr2 a produit des taux de FIX considérés comme thérapeutiques. L'administration du vecteur n'a pas été associée à une toxicité aiguë ou chronique, démontrant ainsi que l'AAVr2 peut transduire le foie humain et permettre l'expression du FIX à des taux thérapeutiques. Cependant, contrairement à l'expression à long terme observée dans le modèle animal, le taux de FIX a commencé à chuter 4 semaines post-injection, et est retourné progressivement à sa valeur avant traitement au bout de 2 mois post-injection. Cette perte d'expression du transgène a été accompagnée d'une augmentation transitoire des enzymes hépatiques transaminases. Un autre patient traité ensuite avec une dose 5 fois plus faible d'AAVr2 a également développé une telle hépatite (Manno *et al.*, 2006). Les causes toxiques ou infectieuses des hépatites, ou autre causes non reliées au transfert de gène ont toutes été exclues. Aucun anticorps anti-FIX n'a été détecté chez ces deux patients. L'analyse de la réponse cellulaire dans les cellules sanguines mononucléées a

révélé la production d'IFN- γ en réponse à leur stimulation par des peptides de la capsid AAV2, mais pas par des peptides du FIX, indiquant que la perte d'expression du FIX n'est pas due à une réponse immunitaire contre le produit du transgène, mais bien contre la capsid du vecteur (Manno *et al.*, 2006). L'identification des épitopes responsables a permis la synthèse de pentamères CMH-I pour la quantification des LT CD8⁺ spécifiques de la capsid, et a montré la présence de lymphocytes T mémoires (Mingozzi *et al.*, 2007b). Ces résultats suggèrent que les épitopes de la capsid, présentés sur le CMH-I des cellules hépatiques transduites, ont été reconnus et éliminés par des LT CD8⁺. Les antigènes de la capsid n'étant pas synthétisés par les cellules transduites, ils ont donc probablement atteint les molécules du CMH-I par cross-présentation (Herzog, 2007; Mingozzi *et al.*, 2007b).

Il a été montré chez l'homme que les LT mémoires spécifiques de la capsid AAV2 cross-réagissaient avec les épitopes des capsides AAV1 et 8 en induisant la prolifération de LT CD8⁺ indifférenciables de ceux induits par les épitopes de la capsid AAV2 (Mingozzi *et al.*, 2007b). La même observation avait été faite chez la souris (Sabatino *et al.*, 2005). Ceci peut s'expliquer par le fait que les LT reconnaissent des petits peptides (9 acides-aminés) générés par la digestion protéolytique des protéines et que les séquences des protéines de capsides des différents sérotypes d'AAV sont hautement conservées (par exemple, la séquence protéique de la capsid AAV8 présente 83% d'homologie avec celle de l'AAV2). Cependant, les différences de cinétique du désassemblage de la capsid selon les sérotypes ont aussi certainement une influence sur la présentation des épitopes de capsid sur le CMH-I, induisant ainsi des réponses cytotoxiques différentes contre les cellules transduites selon les sérotypes. L'immunogénicité accrue de l'AAV2 par rapport aux autres sérotypes pourrait donc s'expliquer en partie par une décapsidation lente conduisant à une présentation de peptides de la capsid par le CMH-I sur des périodes prolongées (Hauck *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004).

Un autre essai clinique ayant pour cible le muscle (décrit plus en détail dans la partie IV-H-1-c de cette introduction) a aussi mis en évidence une réponse cellulaire anti-capsid (sérotipe 1), responsable de la diminution de l'expression de la lipoprotéine lipase en dessous du seuil thérapeutique (Mingozzi *et al.*, 2007d).

De tels effets délétères dus à la réponse cellulaire anti-capsid observés dans ces essais cliniques n'avaient malheureusement pas été prédits par les études précliniques (Mount *et al.*,

2002; Nathwani *et al.*, 2002), et n'ont pas pu par la suite être reproduits dans des modèles animaux pour en élucider précisément les mécanismes impliqués (Mingozzi and High, 2007). Une des hypothèses émises serait le fait que la population humaine est très fortement exposée à des AAV naturels ayant une structure similaire aux vecteurs qui en sont dérivés avant tout transfert de gène, et que la réponse de l'hôte contre les AAV naturels se confond avec celle dirigée contre les AAVr. Même s'il n'est plus possible de mettre en évidence la présence d'une telle immunité pré-existante anti-capside chez les patients de l'essai clinique, les données de la littérature indiquent que 60% des hommes présentent une population de LT mémoires spécifique de la capsid AAV2 (Mingozzi *et al.*, 2007). Cependant, cet argument est recevable pour la plupart des espèces animales, mais pas pour le primate non-humain. En effet, Jiang *et al.* ont tenté de reproduire chez le primate l'hépatotoxicité et la perte d'expression de FIX observés chez l'homme. Ils ont choisi d'administrer aux animaux un AAVr de sérotype 8, puisque les primates sont l'hôte naturel de ce sérotype. Ils supposaient que les animaux recevant le vecteur AAV8 développeraient une réponse cellulaire mémoire contre la capsid AAV, équivalente à celle observée contre l'AAVr2 chez l'homme. Cependant, même l'administration de fortes doses d'AAVr8 codant le FIX n'a pas entraîné d'hépatite chez le primate (Jiang *et al.*, 2006a). De nouvelles investigations sont donc nécessaires pour tenter de comprendre ce qui s'est passé chez les 2 patients de l'essai clinique FIX.

3. Stratégies développées pour s'affranchir des réponses anti-capsid

Plusieurs stratégies ont été développées afin d'éviter l'activation d'une réponse immunitaire contre la capsid des vecteurs AAV (Zaiss and Muruve, 2005; Zaiss and Muruve, 2008).

a. Immunosuppression transitoire

Une immunosuppression transitoire au moment de la première exposition à l'AAVr peut prévenir le développement d'anticorps neutralisants dirigés contre la capsid chez des animaux naïfs (Chirmule *et al.*, 2000; Halbert *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 2006a; Wang *et al.*, 2007c). Dans une étude récente, l'utilisation d'un traitement immunomodulateur à base d'anticorps anti-CD40 et de CTLA4-Ig pendant 5 jours après chaque injection intramusculaire (IM) dans un modèle de souris mdx a suffi pour prévenir totalement la formation d'anticorps

anti-AAV1, et a ainsi permis l'expression du transgène et la correction de la dystrophie musculaire dans plusieurs muscles après des injections successives du vecteur AAV1 (Lorain *et al.*, 2008).

La mise en place d'un traitement immunosuppresseur est aussi une stratégie utilisée pour bloquer la réponse cellulaire de l'hôte contre la capsid AAVr. En effet, en théorie, la capsid AAVr n'est présente que transitoirement dans les cellules transduites avant d'être éliminée, puisqu'elle n'est pas codée par le génome du vecteur. Les immunosuppresseurs tels que cyclosporine, sirolimus et daclizumab bloquent la réponse cellulaire cytotoxique en inhibant soit la production d'IL-2, soit la sensibilité des cellules à l'IL-2. Ces drogues sont habituellement associées au mycophénolate mofétil (MMF), un inhibiteur de la synthèse *de novo* des bases puriques, ce qui affecte la prolifération des LB et LT. Un autre médicament utilisé est la globuline anti-thymocyte, un mélange d'anticorps de lapin dirigés contre les cellules T humaines. Wang *et al.* ont montré qu'une injection intramusculaire d'AAVr2 ou d'AAVr6 dans un modèle canin induit une forte réponse cellulaire contre la capsid. L'injection de capsides AAVr6 vides déclenche également la même réponse cellulaire (Wang *et al.*, 2007b). Un traitement immunosuppresseur de 3 mois (globuline anti-thymocytes, MMF et cyclosporine) commencé au moment de l'administration du vecteur a été suffisant pour permettre une expression à long terme du transgène (micro-dystrophine canine) dans le muscle ces chiens (Wang *et al.*, 2007c).

Les protocoles d'immunosuppression doivent cependant être bien choisis pour produire les effets désirés *in vivo*. La figure 11 représente les traitements immunosuppresseurs les plus utilisés et leur site d'action.

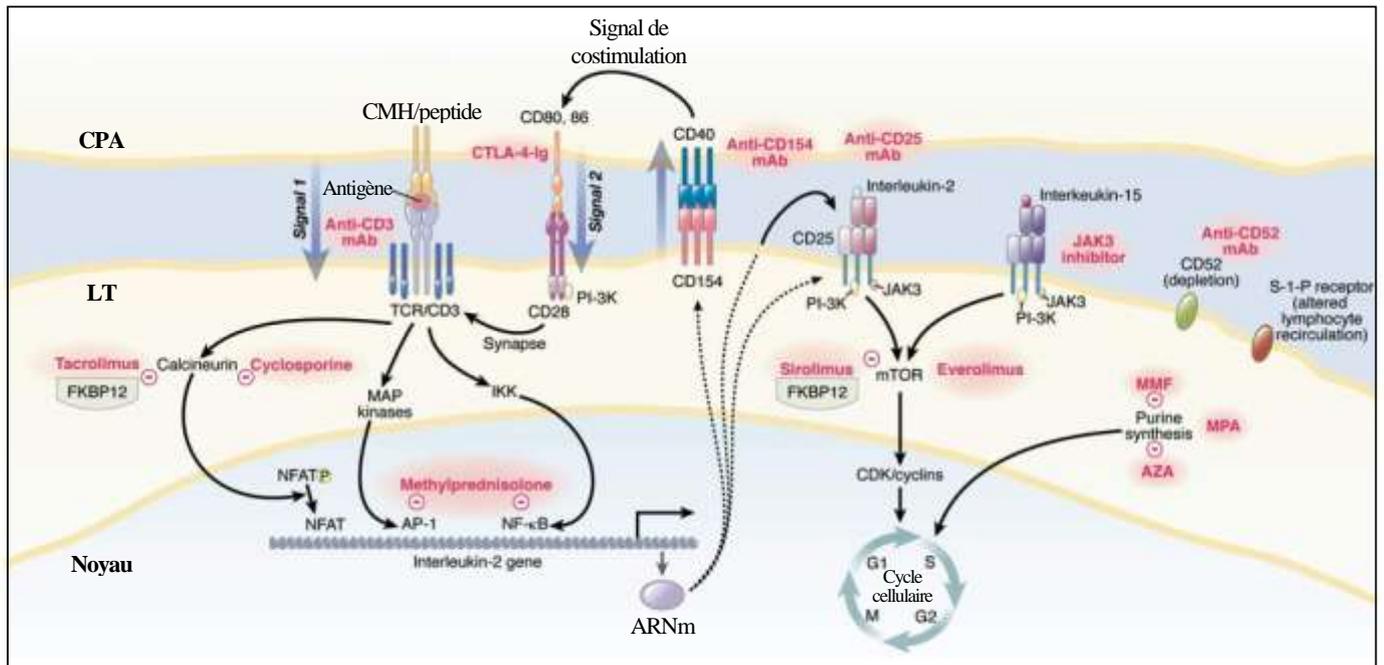


Figure 11 : Drogues immunosuppressives et leur site d'action

D'après (Rosen, 2008). Le complexe antigène/CMH active le TCR et la formation d'une synapse (signal 1). B7-1 et B7-2 des CPA se lie au CD28 du LT et apporte le signal 2. Ces 2 signaux activent plusieurs voies : calcineurine, MAP-kinase et NFκB, qui a leur tour active des facteurs de transcription nucléaires des LT activés (NFAT), la protéine 1 (AP-1) et le NFκB. Il y a alors expression de CD154 ou CD40L (qui pourra activer des CPA), la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), et l'IL-2. Le CTLA4Ig se fixe au CD28 empêchant ainsi l'interaction CD28/B7, signal indispensable à l'activation des LT. Cyclosporine et tacrolimus inhibent la calcineurine, ce qui empêche l'activation de plusieurs gènes (dont celui de l'IL-2, important dans l'activation des LT). Les corticostéroïdes ciblent des facteurs de transcription, bloquant la production de nombreuses cytokines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6). Les anticorps anti-CD25 se fixent aux récepteurs de l'IL-2 et amorce le cycle cellulaire. Les lymphocytes ont besoin de la synthèse de bases purines et pyrimidines pour la réplication. Les drogues comme le mycophénolate mofétil (MMF), l'acide mycophénolique (MPA) ou l'azathioprine (AZA) empêchent la synthèse des bases purines, ce qui boque la différenciation et la prolifération des LT et des LB. Des futures thérapies bloqueront des récepteurs de certaines cytokines comme les inhibiteurs des Janus kinases 3 (JAK3), qui inhibe la transmission du signal permettant la prolifération lymphocytaire. Les récepteurs sphingosine-1-phosphate (S-1-P) jouent un rôle important dans le trafic lymphocytaire, leur permettant d'aller vers les tissus lymphoïdes. Le premier agent ciblant ce mécanisme (FTY720) a été abandonné en raison de sa toxicité.

Une de ces molécules immunosuppressives a été utilisée dans mes travaux de thèse. C'est pourquoi son mécanisme d'action est détaillé ci-après. Il s'agit du LEA29Y, mutant de la molécule de fusion CTLA4-Ig.

La protéine CTLA4-Ig fait partie de la nouvelle génération d'immunosuppresseurs. Cette molécule est une protéine soluble chimère comportant le domaine extracellulaire du CTLA4 humain fusionné au fragment Fc de l'IgG1 humaine. C'est un inhibiteur du signal de costimulation indispensable à l'activation complète des lymphocytes T. La partie CTLA4 de

la protéine de fusion entre en compétition avec le CD28 pour se lier aux récepteurs B7 des cellules présentatrices d'antigènes, et bloque ainsi le signal de costimulation (Lenschow *et al.*, 1996) (figure 12). Il y a alors blocage de l'activation des LT.

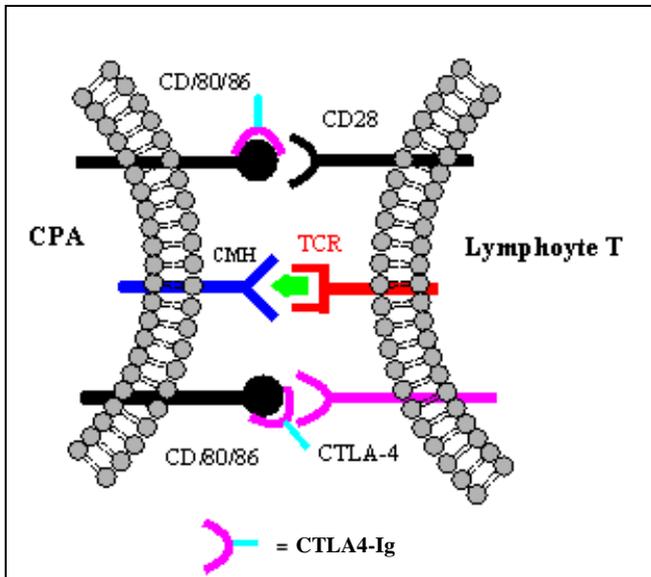


Figure 12 : Mode d'action du CTLA4-Ig

CTLA4-Ig se fixe par sa partie CTLA4 aux molécules CD80 ou CD86 présentes à la surface des CPA, empêchant ainsi l'interaction entre le CD28 à la surface des LT et les CD80/86 de la CPA, signal de costimulation indispensable à l'activation complète des LT.

De nombreuses études *in vivo* ont démontré les propriétés immunosuppressives du CTLA4-Ig. Chez la souris, CTLA4-Ig est capable de prévenir un rejet de greffe d'organe, de bloquer le développement de certaines maladies auto-immunes, et d'inhiber les réponses immunitaires humérales et cellulaires dans le contexte d'allogreffes (Guillot *et al.*, 2000) (Laumonier *et al.*, 2003). Par exemple, CTLA4-Ig permet d'augmenter la survie de greffes de cœur ou de rein (Benigni *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Chez le primate, CTLA4-Ig prévient également les rejets d'allogreffes par inhibition des réponses cellulaires et humérales (Cabrian *et al.*, 1996) (Cabrian *et al.*, 1996; Levisetti *et al.*, 1997).

Un point important à noter est que cette molécule immunosuppressive est depuis un an commercialisée en France sous le nom d'Orencia® (abatacept). Elle est réservée à l'usage hospitalier (administration par perfusion IV) pour le traitement, en association avec le méthotrexate, de la polyarthrite rhumatoïde active modérée à sévère chez les patients adultes ayant eu une réponse insuffisante ou une intolérance aux autres traitements de fond comme le méthotrexate et autres anti-TNFalpha (Genovese *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2008; Kremer *et al.*, 2003; Ruperto *et al.*, 2008; Schiff *et al.*, 2008). Aucun effet secondaire sérieux n'a été décrit suite à son utilisation chez l'homme. De plus, CTLA4-Ig est également en cours d'essais cliniques pour le traitement d'autres maladies auto-immunes comme le psoriasis, la

maladie de Crohn, le lupus, la spondylarthrite ankylosante ou le diabète de type 1 (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=abatacept>).

CTLA4-Ig a également prouvé son efficacité dans le contexte du transfert de gène *in vivo* à l'aide de vecteurs viraux. Plusieurs études chez la souris ont montré que la molécule CTLA4-Ig apportée par voie systémique à l'aide d'un vecteur adénoviral permet d'obtenir une expression stable du transgène (GFP ou dystrophine) après son transfert dans le muscle à l'aide d'un second adénovirus. CTLA4-Ig permet alors une inhibition de la réponse immunitaire (cellulaire principalement Th1, et humorale) dirigée contre le vecteur véhiculant le transgène (Jiang *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004a; Jiang *et al.*, 2004b). CTLA4-Ig permet également une transduction efficace lors d'une seconde administration d'un vecteur AAVr de même sérotype, par inhibition de la réponse humorale neutralisante dirigée contre la capsid AAV (Halbert *et al.*, 1998; Lorain *et al.*, 2008).

Cependant, des doses relativement élevées de CTLA4-Ig sont nécessaires pour induire une immunosuppression efficace, ce qui limite son application chez l'homme (principalement en terme de coût). Récemment, un mutant du CTLA4-Ig appelé LEA29Y (ou Belatacept) a été décrit (Larsen *et al.*, 2005). Il comporte deux mutations ponctuelles dans le domaine de hCTLA4, ce qui lui confère une plus forte affinité pour les récepteurs B7 des CPA. Par conséquent, des doses plus faibles de cette molécule suffisent pour obtenir un effet immunosuppresseur thérapeutique. Le LEA29Y est actuellement en essai clinique de phase III pour la transplantation rénale, et de phase II pour la polyarthrite rhumatoïde (Moreland *et al.*, 2002; Vanhove and Soullou, 2005; Vincenti *et al.*, 2005).

Les traitements immunosuppresseurs ne résolvent cependant pas le problème des anticorps circulants pré-existants dans la population humaine. Murphy *et al.* ont montré que la clairance pour les sérotypes 2 et 8 était comprise entre 2 et 4h chez la souris après injection par la veine porte ou la veine de la queue. Il faudrait donc bloquer les anticorps neutralisants circulants pendant au moins 4h après l'injection d'AAVr pour prévenir la neutralisation du vecteur (Murphy *et al.*, 2008), ce qui ne semble pas facilement réalisable. C'est pourquoi quelques études ont tenté de modifier directement la capsid AAV afin d'échapper à la neutralisation des anticorps pré-existants.

b. Modifications de la capside

Afin d'échapper à la neutralisation par les anticorps anti-AAV pré-existants, des AAVr mutants ont été générés par mutation dans la capside (figure 5E-F p.25). Le but est de supprimer les épitopes incriminés (Huttner *et al.*, 2003; Lochrie *et al.*, 2006; Maheshri *et al.*, 2006). La création rationnelle des vecteurs mutants a nécessité une connaissance précise de l'emplacement des épitopes concernés. Les domaines de la capside présentant les principaux épitopes ont été caractérisés pour l'AAVr2 (Moskalenko *et al.*, 2000; Wobus *et al.*, 2000). De plus, les mutations apportées ne doivent pas altérer les fonctions virales indispensables à un transfert de gène efficace (infectiosité). Pour certains mutants ainsi créés, l'affinité des anticorps anti-capside est réduite de plus de 70% par rapport à l'AAV2 sauvage (Huttner *et al.*, 2003). Cependant, leur rendement de production est diminué comparé à celui de l'AAVr2 (Girod *et al.*, 1999).

Des modifications chimiques de la capside peuvent aussi permettre d'échapper à la neutralisation par les anticorps. Des polymères synthétiques (polyéthylène glycol : PEG) ont été conjugués aux protéines de la capside dans le but de protéger le vecteur des anticorps neutralisants (Le *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Cependant, les limites de cette approche sont la difficulté à contrôler le nombre et le site des conjugaisons, la protection incomplète de la totalité de la surface virale, et la diminution de l'infectiosité du vecteur à de forts taux de PEGylation.

c. Utilisation de sérotypes différents

De nombreuses études ont montré que les anticorps neutralisants naturellement acquis pour un sérotype ne cross-réagissent pas avec la capside d'un autre sérotype, permettant ainsi la transduction consécutive de sérotypes différents, que ce soit chez la souris ou le primate (Gao *et al.*, 2002; Grimm and Kay, 2003; Nathwani *et al.*, 2007; Peden *et al.*, 2004; Riviere *et al.*, 2006).

Cependant, la population humaine est naturellement séropositive pour un grand nombre de sérotypes d'AAV. En effet, il a été détecté des anticorps neutralisants anti-AAV8 dans la population humaine, bien qu'à une fréquence bien moins élevée que pour l'AAV2 (3,8% vs 20%) (Gao *et al.*, 2002). De même, une étude a montré que 20-30% des adultes étaient séropositifs pour l'AAV6, 10-20% pour l'AAV5, et 30% pour l'AAV2. Chez les enfants, la prévalence de l'AAV2, 5 ou 6 était de 4-15% (Halbert *et al.*, 2006).

L'isolement de nouveaux sérotypes plus éloignés phylogénétiquement serait donc nécessaire pour contrer la neutralisation par une immunité humorale naturelle acquise chez l'homme. L'AAV de sérotype 10, d'origine simienne semble être un bon candidat (De *et al.*, 2006).

Malgré tout, cette approche ne permettra peut-être pas de prévenir la réponse cellulaire mémoire anti-capside, puisque les LT générés en réponse à l'exposition de la capsid AAV de certains sérotypes sont capables de reconnaître les peptides des séquences protéiques conservées des autres sérotypes comme mentionné au chapitre précédent (Mingozzi *et al.*, 2007b; Sabatino *et al.*, 2005).

D. Réponse immunitaire contre le produit du transgène

1. Réponse humorale

Les premières observations de réponses immunitaires dirigées contre le produit d'un transgène apporté par un AAV recombinant ont été faites suite à des injections intramusculaires d'AAV2 codant le facteur IX. Que ce soit chez des souris immunocompétentes traitées avec le FIX humain (Herzog *et al.*, 1997), ou chez des chiens ayant une mutation nulle traités avec le FIX canin (Herzog *et al.*, 2001), la formation d'une réponse humorale contre le FIX a empêché la protéine FIX d'atteindre des taux détectables dans la circulation. Dans un modèle canin avec une mutation non-sens, l'augmentation des doses de vecteur injectées en intramusculaire conduit à une production accrue d'anticorps anti-FIX (Herzog *et al.*, 2002). Cependant, dans une étude chez la souris, Zhang *et al.* ont montré que la dose d'AAVr1 injectée était inversement corrélée à la quantité d'anticorps produits : à de fortes doses d'AAVr1, aucun anticorps anti-FIX n'a été détecté chez des souris knock-out pour le FIX. Une cinétique d'expression lente et faible pourrait être responsable de la formation d'anticorps inhibiteurs, plutôt que la dose ou le sérotype du vecteur utilisé (Zhang *et al.*, 2007). Cependant, ces résultats n'ont pas été retrouvés dans une autre étude où la formation d'anticorps a été observée contre le produit du transgène apporté par l'AAVr1 après une injection intramusculaire à forte dose dans des modèles murin et canin (Arruda *et al.*, 2004).

Le développement de la réponse humorale dirigée contre le produit du transgène peut être délétère pour l'animal (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a). Il est probable que des taux d'expression élevés de protéines recombinantes à partir d'un site ectopique entraînent une rupture de tolérance. Cette réponse humorale limite non seulement l'efficacité du transfert de gène par la perte progressive de l'expression de la protéine thérapeutique, mais empêche aussi l'administration ultérieure de la protéine thérapeutique par d'autres méthodes que la thérapie génique. En effet, une fois la réponse humorale mise en place suite au transfert de gène, l'administration de la protéine thérapeutique par enzymothérapie substitutive par exemple ne sera plus efficace. Le transfert de gène peut être assimilé, dans ces cas là, à un moyen de vaccination contre le produit du transgène.

2. Réponse cellulaire

Plusieurs études ont mis en évidence la présence de populations lymphocytaires T spécifiques du produit du transgène dans les compartiments lymphoïdes chez la souris. Après une injection intramusculaire d'AAVr2-FIX, une réponse immunitaire cellulaire locale a été observée dans les ganglions lymphatiques drainants. Cette réponse semble influencer sur la formation d'anticorps anti-FIX (Wang *et al.*, 2005a). Une réponse cellulaire et humorale ont également été observées chez des souris suite à l'administration d'AAVr exprimant l'ovalbumine comme marqueur immunologique (Brockstedt *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005b; Wuensch *et al.*, 2006).

L'activation de LT spécifiques du produit du transgène entraîne dans certains cas l'élimination par les LTc des cellules exprimant le transgène (Brockstedt *et al.*, 1999; Favre *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005b). D'autres études ont décrit *in vivo* la destruction des cellules transduites après un transfert adoptif de lymphocytes antigène-spécifiques (Wuensch *et al.*, 2006) ou par immunisation préalable avec un vecteur adénoviral exprimant le transgène (Jooss *et al.*, 1998).

Jooss *et al.* avaient émis comme hypothèse que l'absence de transduction des CPA par l'AAV *in vivo* préviendrait la réponse cellulaire contre le produit du transgène. Il avait en effet été observé une élimination des cellules exprimant le transgène quand des CD immatures avaient été transduites *ex vivo* à une forte MOI (Zhang *et al.*, 2000). C'est pourquoi historiquement, il était admis que l'AAVr n'était pas capable de transduire efficacement les CPA. Ces résultats étaient principalement basés sur des études réalisées *in vitro*.

Actuellement, l'efficacité de transduction des CD à l'aide de vecteurs AAVr est un sujet controversé. Des études récentes ont démontré la capacité de certains sérotypes d'AAVr (principalement l'AAVr5, mais aussi les AAVr1, 2 et 6) à transduire les CD *in vitro* (Aldrich *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Ponnazhagan *et al.*, 2001; Veron *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2006). Ils transduisent suffisamment les CPA pour activer une réponse cytotoxique transgène-spécifique restreinte au CMH-I, avec production significative d'IFN- γ , prolifération de LTc et élimination des cellules transduites. De plus, les scAAVr auraient un tropisme plus important que les AAVr conventionnels pour les CD (Aldrich *et al.*, 2006; Veron *et al.*, 2007). La transduction directe des CD par les AAVr augmente ainsi le risque de développer une réponse immunitaire. Dans ce cas, le déclenchement de la réponse cytotoxique est initié par les CD par présentation directe des peptides antigéniques.

In vivo, plusieurs études de biodistribution ont mis en évidence la présence du génome AAVr dans les PBMC des individus (voir partie IV-E de cette introduction) (Favre *et al.*, 2001). Ceci montre qu'il existe un facteur inexplicé limitant la transduction des CPA *in vitro*, et nous rappelle que les résultats observés *in vitro* ne sont pas toujours représentatifs de ceux obtenus *in vivo*.

3. Facteurs influençant la réponse anti-transgène

Etant donné que la réponse cellulaire (T et B) dirigée contre le produit du transgène repose sur la présentation par les CPA, le développement de la réponse immune dépend en grande partie de la quantité de la protéine, la cinétique de son expression ainsi que de son immunogénicité, en plus du sérotype administré.

a. Voie d'administration et tissu-cible

La voie d'administration et/ou le tissu où est exprimée la protéine jouent un rôle important dans le développement de la réponse cellulaire cytotoxique (Brockstedt *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2005; Mingozi *et al.*, 2003).

Ainsi, une injection intramusculaire provoque fréquemment le développement d'une réponse immunitaire car les antigènes (protéines de capsidite ou produits du transgène) sont concentrés au site d'injection de l'AAVr (Wang *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2005b), alors que la technique

de perfusion de membre isolé avec des vecteurs AAVr développée dans les modèles de dystrophie musculaire et d'hémophilie (Arruda *et al.*, 2005; Gonin *et al.*, 2005; Rodino-Klapac *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2005) permet de faire diffuser rapidement le vecteur dans le membre, évitant ainsi une trop forte concentration du vecteurs aux sites d'injection. La comparaison entre ces 2 modes d'administration a fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse qui sera discutée plus en détail dans la partie « Résultats » de ce manuscrit.

Certains organes, comme le système nerveux central ou l'oeil, sont historiquement considérés comme immunoprivilégiés. Des réponses immunitaires après injections d'AAVr ont tout de même été décrites dans le système nerveux central (Lowenstein *et al.*, 2007; Mastakov *et al.*, 2002; Reimsnider *et al.*, 2007). Ainsi, une seconde injection dans le striatum avec le même vecteur aboutit à une expression plus faible du produit du transgène. Cette baisse d'expression n'est plus observée lorsque le second vecteur code une protéine différente, démontrant ainsi le développement d'une réponse spécifique au produit du transgène (Mastakov *et al.*, 2002).

Le foie est un organe sur lequel de nombreuses questions restent en suspens quant à ses propriétés tolérogènes potentielles.

Il existe de nombreuses études démontrant qu'il a des propriétés tolérogènes (Bowen *et al.*, 2005). Dans plusieurs modèles animaux, un transfert de gène ciblant le foie a été associé à l'induction d'une tolérance envers le produit du transgène (Dobrzynski and Herzog, 2005; Jiang *et al.*, 2006a; Mingozzi *et al.*, 2003 ; Moscioni *et al.*, 2006; Mount *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005a). D'autres études ont montré que l'induction d'une tolérance au produit du transgène au moyen d'un AAVr dans le foie est médiée par les cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Cao *et al.*, 2007; Dobrzynski *et al.*, 2004; Mingozzi *et al.*, 2007a). Ces travaux soulignent l'importance des cellules T régulatrices dans le maintien de la tolérance au produit du transgène. De plus, l'induction d'une tolérance après transfert de gène dans le foie au moyen d'AAVr a permis d'y associer d'autres thérapies comme l'enzymothérapie substitutive (Sun *et al.*, 2007), ou un transfert de gène dans le muscle (Hoffman *et al.*, 2007). En effet, la tolérance au produit du transgène induite après transfert dans le foie est acquise et toute nouvelle présentation de la protéine étrangère à l'organisme, par quelques moyens que ce soit, ne déclenche aucune réponse immunitaire.

Cependant, il existe également des études montrant que le foie en tant que cible pour la thérapie génique au moyen d'AAVr n'est pas associé à l'induction d'une tolérance. En effet,

l'exemple le plus marquant est la mise en évidence d'une réponse immunitaire cellulaire contre la capsidite du vecteur AAV2 dans l'essai clinique FIX de Manno *et al.* (Manno *et al.*, 2006). Comme déjà mentionné auparavant (p.43), l'injection du vecteur par l'artère hépatique a déclenché une réponse anti-capsidite responsable de la perte d'expression du transgène et d'une hépatite transitoire chez les patients.

Actuellement, le mécanisme par lequel un transfert de gène ciblant le foie induit une tolérance dans certains cas reste encore à identifier.

b. Immunogénicité du transgène

La réponse immunitaire développée dépend également de la nature du produit du transgène lui-même. Par exemple, Sarukhan *et al.* ont observé chez la souris une forte réponse humorale et cellulaire conduisant à l'élimination totale des cellules transduites après injection IM d'un AAVr codant l'hémagglutinine HA, alors que la transduction de cellules par un vecteur AAVr codant la β -galactosidase n'a déclenché aucune réponse immunitaire (Sarukhan *et al.*, 2001). Une des hypothèses serait que l'immunogénicité relative du produit du transgène est due à sa propre capacité à être cross-présenté. Cette voie de présentation permettrait à certains antigènes d'activer de fortes réponses immunitaires cellulaires (Sarukhan *et al.*, 2001). Actuellement, le mécanisme d'activation des LT n'est pas encore totalement élucidé, et la fréquence des événements de transduction directe des CPA vs la cross-présentation n'est pas connue.

L'apparition d'anticorps dirigés contre le produit du transgène peut souvent être évitée en administrant un immunosuppresseur au moment de l'injection (Herzog *et al.*, 2001).

Un traitement immunosuppresseur à base de sirolimus et MMF a permis de prévenir toute formation d'anticorps anti-FIX après transfert de gène hépatique à l'aide d'un AAVr-hFIX chez le primate (Mingozzi *et al.*, 2007a). Cependant, la mise en place d'une immunosuppression plus forte (Sirolimus, MMF et daclizumab un anticorps anti-récepteur de l'IL-2) n'a pas eu l'effet escompté et n'est pas parvenu à prévenir la production d'anticorps anti-FIX chez les animaux injectés. Ce fort traitement immunosuppresseur a en effet induit une baisse très importante de la population de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Mingozzi *et al.*, 2007a), responsable de la rupture de « tolérance » vis à vis du FIX humain.

Une autre approche pour limiter le développement de la réponse immunitaire est d'induire chez les animaux une tolérance vis-à-vis du transgène (Gross *et al.*, 2003; Marodon *et al.*, 2006). Contrairement aux immunosuppresseurs, la tolérance, une fois induite, agit de façon prolongée et n'immunodéprime pas l'individu. Elle est spécifique d'un antigène, c'est-à-dire que l'individu gardera un système immunitaire efficace vis-à-vis des autres molécules immunogènes, tout en ne réagissant plus contre l'antigène ciblé. L'utilisation de cellules T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ semble être une voie promotrice pour engendrer une tolérance *in vivo* vis-à-vis d'un produit du transgène (pour revue : Cao *et al.*, 2007). Cependant, cette approche ne sera pas détaillée dans ce manuscrit.

c. Quantité de protéine synthétisée

La dose de vecteur injectée et la quantité de protéine produite peuvent également moduler la réponse immune contre le produit du transgène. La réponse immune est généralement dose-dépendante (Herzog *et al.*, 2002), et peut ainsi être évitée par une restriction de l'expression du transgène, en utilisant par exemple un promoteur tissu-spécifique à la place d'un promoteur ubiquitaire (Cordier *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2005; Ziegler *et al.*, 2004) (voir partie IV-E de cette introduction p.63).

d. Le sérotype utilisé

Comme mentionné précédemment (paragraphe III-D-2 p.51), certains sérotypes d'AAVr (l'AAVr5 en particulier) et également les scAAVr sont capables de transduire efficacement les CD *in vitro* (Aldrich *et al.*, 2006; Ponnazhagan *et al.*, 2001; Veron *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2006). Ces sérotypes sont donc potentiellement plus immunogènes que ceux ayant un faible tropisme pour les CPA.

Cependant, *in vivo* contrairement à *in vitro*, l'AAVr2 est capable de transduire les PBMC des individus injectés. Il a en effet été démontré qu'après administration de vecteurs AAVr2, du génome du vecteur est détecté dans les PBMC et ganglions drainants chez le primate et l'homme (Favre *et al.*, 2001; Manno *et al.*, 2006). Ceci pourrait être un des éléments déclencheurs de l'activation du système immunitaire de l'hôte.

4. Vaccination à l'aide de vecteurs AAVr

Des stratégies d'immunisation au moyen d'AAVr contre des agents infectieux comme le CMV (Gallez-Hawkins *et al.*, 2004), le SIV (Johnson *et al.*, 2005), le HIV (Xin *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001), et l'herpès virus simplex de type 2 (Manning *et al.*, 1997) ont permis d'obtenir de fortes réponses humorales, et/ou cellulaires dirigées contre le produit du transgène. L'AAVr est aussi capable de provoquer une réponse immunitaire humorale contre des auto-antigènes (During *et al.*, 2000), ou cellulaire contre des antigènes tumoraux comme l'oncoprotéine E7 du papillomavirus de type 16 humain (Liu *et al.*, 2000).

Dans une étude récente, Xin *et al.* ont comparé l'utilisation de différents sérotypes (AAVr1, 2, 3, 4, 5, 7 et 8) en tant que vaccins contre la protéine gp160 du virus de l'immunodéficience humaine chez la souris. Tous les sérotypes testés ont été capables d'induire une réponse humorale et cellulaire contre le produit du transgène. Cependant, l'AAVr5, en comparaison avec les autres sérotypes testés, a permis d'obtenir de plus forts taux d'anticorps anti-gp160 ainsi que de nombreux splénocytes sécrétant de l'IFN- γ . L'AAVr5 transduisant les cellules dendritiques CD11+ murines et humaines plus efficacement *in vitro*, la capacité d'un sérotype à transduire les CPA serait corrélée à l'efficacité de la vaccination, et donc à la capacité d'un sérotype donné à engendrer une réponse immunitaire forte (Xin *et al.*, 2006).

Cependant, quelques études indiquent que l'AAVr ne serait pas un candidat idéal pour la vaccination (Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b; Logan *et al.*, 2007). En effet, si l'administration de l'AAVr induit bien la production d'anticorps et de cellules T CD8+ spécifiques du transgène, ces LT, suite à une seconde immunisation de rappel, prolifèrent peu, sécrètent de faibles taux d'IFN- γ en réponse à la stimulation par l'antigène, et induisent la production de molécules inhibitrices comme PDL-1 (*Programmed Death Ligand-1*). Ils n'induisent donc pas d'immunité protectrice contre l'agent pathogène.

Une vaccination au moyen de l'AAVr est donc possible dans plusieurs modèles animaux, mais essentiellement pour des antigènes fortement immunogènes (principalement des antigènes viraux).

IV. Transfert de gène dans le muscle squelettique à l'aide d'AAVr

A. Généralités

Le muscle squelettique est bien évidemment le tissu cible de choix pour le traitement par thérapie génique de toutes les maladies génétiques neuromusculaires (myopathies, amyotrophies,...). Mais en plus de ces applications, de nombreuses caractéristiques font de ce tissu une cible privilégiée pour tenter de corriger les déficiences génétiques en protéines solubles (comme dans le cas de l'hémophilie A et B (Chao *et al.*, 2001), le déficit en alpha-1-antitrypsine (Song *et al.*, 1998)) en faisant sécréter par les fibres musculaires des protéines thérapeutiques dans la circulation sanguine.

En effet, le muscle représente 40% de la masse corporelle totale d'un adulte et est facilement accessible pour l'administration d'un vecteur, sans geste invasif, par une simple injection intramusculaire. De plus, les fibres musculaires ont une demi-vie relativement longue *in vivo*, avec un faible taux de renouvellement. Ainsi, les gènes introduits ne subissent pas de phénomène de dilution à la suite des mitoses, ce qui permet une production durable de protéines thérapeutiques par le muscle. Enfin, les fibres musculaires sont fortement vascularisées et ont la capacité de sécréter facilement dans la circulation sanguine une protéine recombinante, ce qui est nécessaire pour corriger les déficiences protéiques par thérapie génique à partir du muscle (Ross *et al.*, 2004).

Une telle approche pour traiter des maladies génétiques présente donc un net avantage sur l'administration directe chez les patients des protéines recombinantes qui ont une demi-vie relativement courte, et nécessite des injections répétées tout au long de la vie du malade.

Le vecteur idéal pour un transfert de gène dans le muscle doit être capable de transduire efficacement les cellules différenciées et post-mitotiques que sont les fibres musculaires, soit pour y corriger la quasi-totalité des cellules affectées (pour les maladies neuromusculaires), soit de façon à obtenir une quantité sérique du produit du transgène considérée comme thérapeutique (pour les maladies métaboliques).

L'AAVr est vite apparu comme un vecteur regroupant toutes ces qualités. Il transduit efficacement le muscle squelettique, peut persister pendant plusieurs années dans les cellules transduites, et permet d'obtenir une expression stable de protéines thérapeutiques solubles

(Clark *et al.*, 1997; Favre *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 1997; Herzog *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 1996; Monahan *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1996).

B. L'injection intramusculaire d'un AAVr et ses limites

L'injection intramusculaire est une technique d'administration du vecteur simple et non invasive pour l'individu. Cependant, un des problèmes limitant le plus l'efficacité d'un transfert de gène par IM au moyen d'un AAVr est le déclenchement d'une réponse immunitaire, associée à la détection du génome AAVr dans les PBMC et les ganglions lymphatiques drainants des animaux injectés (Favre *et al.*, 2001).

Au niveau de la présentation des antigènes du produit du transgène, plusieurs voies sont possibles après une IM (figure 13) :

- soit le vecteur transduit les cellules cibles qui sont les cellules musculaires. Les CPA locales capturent alors les antigènes exprimés par les cellules transduites et présentent des peptides de la protéine soit sur le CMH-II aux LT CD4⁺ par la voie directe de présentation d'antigènes exogènes, soit sur le CMH-I aux LT CD8⁺ par cross-présentation (Sarukhan *et al.*, 2001). Lors de ce mécanisme de cross-présentation, la réponse cytotoxique est plus lente à se mettre en place par rapport à une présentation directe du peptide antigénique (Wang *et al.*, 2005a).
- soit le vecteur AAV transduit directement des CPA, comme les cellules dendritiques (Favre *et al.*, 2001). L'antigène y est alors synthétisé et est présenté par voie directe aux LT CD8⁺ sur le CMH-I.
- soit les cellules musculaires transduites présenteraient elles-mêmes sur des molécules de CMH-I (sous réserve que leur niveau d'expression soit suffisant) des peptides endogènes (ceux du produit du transgène) par voie directe ou des peptides exogènes (ceux de la capsid) par cross-présentation, et activeraient directement leur destruction par des LT CD8⁺ spécifiques de ces antigènes. Ce dernier point sera discuté dans la partie II-C des Résultats.

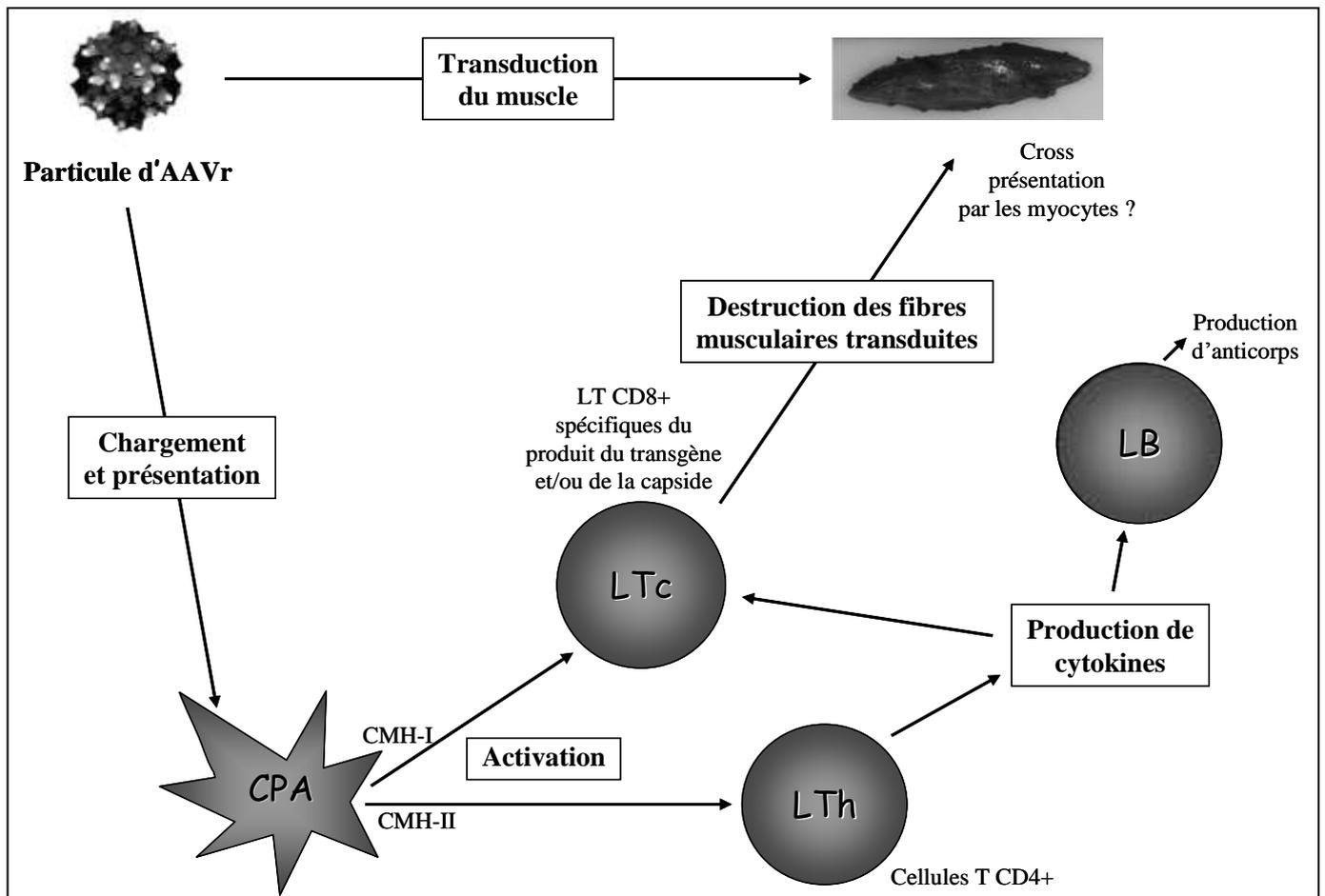


Figure 13 : Evénements immunologiques pouvant survenir suite à une injection IM d'AAVr

D'après (Herzog, 2007).

La présentation des antigènes (de capsidie ou du produit du transgène) par la voie classique par les CPA conduit à l'activation de lymphocytes T CD4+ (LTh1 ou LTh2 selon l'antigène) qui vont alors produire différentes cytokines activant soit une réponse à médiation cellulaire (LTh1) soit une réponse à médiation humorale (LTh2).

La cross-présentation (pour les antigènes de capsidie ou du produit du transgène) ou la transduction directe des CPA par le vecteur (pour les antigènes du produit du transgène) peuvent conduire à l'activation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques de l'antigène, capables ensuite de détruire les myocytes transduits.

Les myocytes eux-mêmes pourraient aussi présenter sur le CMH-I des peptides provenant de la dégradation du produit de transgène et/ou des protéines de capsides par le protéasome, ce qui activerait directement des LT CD8+ responsables de leur élimination.

Deux études indépendantes ont également décrit le développement d'une réponse immune contre un produit du transgène codant une protéine du soi (érythropoïétine autologue) après injection IM à l'aide d'AAVr1 dans le muscle de primate (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a). Les causes de cette rupture de tolérance n'ont pas été établies : soit la surexpression

d'une protéine, entraînant par exemple des modifications post-traductionnelles différentes de la protéine endogène, soit le vecteur en lui-même ont pu contribuer à l'activation de cette réponse immune.

C. Autres voies d'administration d'un AAVr ciblant le muscle

Après une injection intramusculaire, le transgène est fortement exprimé dans les cellules situées près du site d'injection alors que la protéine n'est souvent plus détectable dans les muscles à distance. Outre le fait que cela augmente le risque d'activation du système immunitaire de l'hôte, la faible diffusion de la transduction n'est cependant pas gênante lorsque l'objectif du transfert de gène est de faire sécréter une protéine dans la circulation sanguine, pour traiter des maladies métaboliques par exemple. Il suffit en effet, dans ce cas, que les cellules transduites expriment assez fortement le transgène pour que la protéine soit produite en quantité suffisante dans le sang. Cependant, cette voie est inadaptée lorsque le transfert de gène a pour but le traitement de maladies neuromusculaires. En effet, dans de telles maladies, une grande majorité voire la totalité des cellules des muscles affectés doivent être transduites par le vecteur pour espérer corriger le phénotype. De multiples injections IM doivent donc être réalisées dans de nombreux muscles pour pallier à ce manque de diffusion. Une telle procédure est cependant trop contraignante pour le patient, et certains muscles ne sont pas aisément accessibles par voie intramusculaire directe.

Des études menées chez un modèle de chien hémophile ont aussi montré qu'il fallait limiter la quantité de vecteur AAV injectée par site d'injection IM à moins de 10^{12} particules totales afin de diminuer les risques de réponse immunitaire (Herzog *et al.*, 2002), et cela pour plusieurs raisons :

- le risque de formation d'anticorps neutralisants contre le produit du transgène est corrélé à la dose d'AAVr au niveau du site d'injection (Herzog *et al.*, 2002)
- les cellules musculaires ont une capacité limitée pour réaliser les modifications post-traductionnelles des protéines synthétisées (Arruda *et al.*, 2001b)
- la fixation des particules virales à la surface des cellules cibles se fait par des récepteurs qui peuvent être saturés (Summerford and Samulski, 1998).

Cette limitation de dose par site d'injection, appliquée à l'homme, demande un nombre considérable d'injections IM pour administrer la dose de vecteur suffisante pour traiter une

maladie, même parfois dans le cas où le transgène est sécrété dans la circulation sanguine (Manno *et al.*, 2003).

D'autres voies d'administration du vecteur AAV ayant pour cible le tissu musculaire squelettique ont donc été développées, par voie systémique, puisque chaque fibre musculaire est très vascularisée. Cependant, l'AAVr2 ne franchissant que très peu les parois des vaisseaux, une solution a consisté à perturber l'intégrité des parois endothéliales au moment du transfert de gène, de manière à faciliter le passage du vecteur du compartiment vasculaire au tissu musculaire. Des vasodilatateurs, comme l'histamine et la papavérine ont permis d'obtenir cet effet, avec une bonne efficacité chez le rongeur. Ainsi, après isolation du membre postérieur de la circulation sanguine par un garrot, une injection intra-artérielle a montré une expression du transgène dans tous les muscles du membre ainsi perfusé (Greelich *et al.*, 1999). Une autre méthode de perfusion de membre isolé a aussi montré son efficacité chez le gros animal (chien), en utilisant les mêmes vasodilatateurs que Greelich *et al.*, et en perfusant le membre isolé sous pression par voie artérielle (Arruda *et al.*, 2005). Enfin, une étude a montré une expression du transgène dans la majorité des muscles squelettiques du modèle murin *mdx* après injection intraveineuse d'un vecteur AAVr6 en utilisant le VEGF et l'héparine pour augmenter la perméabilité vasculaire (Gregorevic *et al.*, 2004).

Cependant, bien que toutes ces voies d'administration aient montré leur efficacité pour un transfert de gène dans les modèles animaux, l'utilisation de drogues pour augmenter la perméabilité vasculaire, ainsi que le fait de passer par voie intra-artérielle, limitent l'application de ces techniques à l'homme, à cause des risques d'hémorragie et d'instabilité hémodynamique.

Une équipe a alors mis au point une technique de perfusion de membre isolé chez le rat et le chien sans utilisation de drogue et en administrant le vecteur par voie intraveineuse sous pression (Su *et al.*, 2005). Cette technique est bien tolérée et efficace. Elle permet une expression significative du transgène dans tous les muscles du membre perfusé, sans utilisation de drogue, avec une dose de vecteur équivalente à celle utilisée pour les injections IM. Ainsi, cette technique évite des fortes densités de vecteur localisées, et permet une distribution plus homogène du vecteur dans tout le membre, ce qui pourrait limiter une éventuelle activation du système immunitaire de l'hôte contre le vecteur et/ou le produit du transgène.

D. Sérotypes d'AAVr possédant un tropisme musculaire

L'AAVr2, premier sérotype utilisé en transfert de gène, n'est pas le sérotype optimal pour transduire le muscle squelettique : il n'induit que de faibles taux d'expression du transgène, ce qui fait que le produit du transgène n'atteint pas toujours la concentration thérapeutique espérée.

Les sérotypes 1, 5, 6, et plus récemment les sérotypes 7 et 8 ont montré une meilleure efficacité que l'AAVr2 pour transduire les cellules musculaires, notamment au niveau des taux de transduction (Arruda *et al.*, 2004; Blankinship *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2001; Duan *et al.*, 2001; Fraites *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002; Hauck and Xiao, 2003; Hildinger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005c).

L'AAVr1, l'AAVr6 par sa forte homologie avec celui-ci, et l'AAVr7 apparaissent comme les plus efficaces après injection intramusculaire du vecteur, que ce soit dans les modèles rongeurs ou grands animaux (Arruda *et al.*, 2004; Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 1999). L'AAVr7 a un avantage supplémentaire non négligeable pour son utilisation chez l'homme : la séroprévalence de ce sérotype (< 6%) semble très faible dans la population humaine comparée à celle de l'AAVr2 (> 20%) (Gao *et al.*, 2002).

L'AAVr8 comparé aux sérotypes 1, 2, 5 et 6 est le plus efficace pour transduire le muscle strié après administration du vecteur par voie intravasculaire chez le rongeur, permettant ainsi de toucher tous les muscles de l'hôte (Wang *et al.*, 2005c). L'AAVr8 a en effet une forte capacité à traverser la barrière capillaire. Contrairement à l'AAVr6, le VEGF (agent permettant d'augmenter la perméabilité vasculaire) n'a pas d'effet sur son efficacité de transduction après injection intra-vasculaire (Gregorevic *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005c).

D'autre part bien que l'AAVr1 soit plus efficace que l'AAVr8 après injection intramusculaire au niveau des muscles des membres injectés dans des modèles murins, on retrouve une expression du transgène à des taux non négligeables dans le cœur et autres muscles éloignés du site d'injection uniquement avec l'AAVr8 (Nishiyama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005c). L'AAVr8 a donc une forte capacité de dissémination par voie sanguine, avec pour cible le muscle squelettique.

E. Biodistribution du vecteur

Le vecteur étant administré directement chez l'individu, il est important, pour la sécurité du transfert de gène, de connaître sa biodistribution suite à l'injection. Les études de biodistribution ont pour objectifs de :

- définir tous les organes et tissus transduits par le vecteur (à court et long terme)
- déterminer les organes atteints par une éventuelle toxicité due au vecteur,
- évaluer le risque de transmission du génome AAVr aux générations futures.

Ces études, indispensables pour déterminer la sécurité biologique d'un transfert de gène, sont pourtant relativement peu nombreuses.

La biodistribution du vecteur dépend de nombreux paramètres : le sérotype d'AAVr injecté, le type de vecteur AAV (simple brin ou double brin), la voie d'administration, ainsi que l'espèce hôte. Il est actuellement démontré que le vecteur, quelque soit son mode d'administration, ne transduit pas uniquement les cellules situées au niveau du site d'injection. Plusieurs études ont effectivement retrouvé du vecteur à distance, et cela même plusieurs années après une injection unique d'AAVr. Ceci a été observé dans divers modèles animaux, y compris chez le primate et chez des patients impliqués dans des essais cliniques de phase I/II. Les sites d'injection pour lesquels on a retrouvé du vecteur à distance sont : la rétine (Jacobson *et al.*, 2006; Provost *et al.*, 2005), le système nerveux central et périphérique (Burger *et al.*, 2004; Burger *et al.*, 2005), le foie (Manno *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2005a), et le muscle squelettique (détaillé ci-après).

Les études de biodistribution après injection intramusculaire ont été réalisées principalement pour le vecteur AAVr de sérotype 2, que ce soit chez le macaque cynomolgus (Favre *et al.*, 2001), le babouin (Song *et al.*, 2002), le chien (Arruda *et al.*, 2001a; Herzog *et al.*, 1999; Monahan *et al.*, 1998), le rat, la souris et le lapin (Arruda *et al.*, 2001a; Flotte *et al.*, 2007). Par contre très peu d'études ont analysé la biodistribution du vecteur de manière approfondie, en recherchant la présence du génome du vecteur dans tous les organes de l'animal injecté.

Une des premières études de biodistribution a montré la présence du vecteur AAVr2 uniquement dans les ganglions lymphatiques drainants suite à une injection IM de $2 \cdot 10^{12}$ vg d'AAV2 chez le chien (Monahan *et al.*, 1998). Favre *et al.* ont démontré la présence d'ADN de l'AAVr2 dans les ganglions drainants et le foie de macaque au moins 18 mois après

l'injection. Le génome du vecteur était également détectable dans les cellules mononucléées du sang (PBMC) jusqu'à 10 mois post-injection.

Wang *et al.* ont détecté la présence de la protéine dans le cœur des animaux ayant reçu une injection IM d'un vecteur AAVr8 dans les 2 membres postérieurs (contrairement aux résultats obtenus avec l'AAVr1) (Wang *et al.*, 2005c). De même, Nishiyama *et al.* ont récemment obtenus, dans un modèle murin de dystrophie des ceintures (LGMD 2D) après une unique injection intramusculaire d'AAVr8 dans le muscle tibial crânial, la restauration de l'expression de la protéine manquante dans les muscles du membre injecté ainsi que dans le membre controlatéral et le muscle cardiaque, et cela au moins 7 mois après injection, avec en outre une amélioration des lésions musculaires (Nishiyama *et al.*, 2008).

D'autres études se sont essentiellement focalisées sur les risques de transmission du vecteur à la descendance et à l'élimination potentielle du vecteur dans l'environnement par les différents fluides biologiques (sérum, salive, sécrétions nasales et lacrymales, urine, selles).

En ce qui concerne les risques de transmission à la descendance, l'ADN du vecteur AAV a été recherché par PCR dans les organes génitaux de plusieurs espèces. Les résultats diffèrent énormément selon les études. Bien qu'aucune séquence du vecteur AAV n'ait été détectée dans la semence ou les testicules des chiens injectés (Arruda *et al.*, 2001a; Monahan *et al.*, 1998), il en a été retrouvé dans les gonades ou l'épididyme chez la souris et le rat (Arruda *et al.*, 2001a). Une étude a démontré que l'AAVr2 mis en présence *in vitro* de spermatozoïdes matures de souris n'était pas capable de transduire ces cellules germinales (Couto *et al.*, 2004).

Il a également été mis en évidence une virémie transitoire post-injection IM chez le lapin, le macaque cynomolgus et l'homme (Arruda *et al.*, 2001a; Favre *et al.*, 2001; Kay *et al.*, 2000). En ce qui concerne la présence éventuelle du vecteur dans les fluides biologiques, Herzog *et al.* en ont détecté par PCR dans les différents fluides (sérum, sécrétions nasales et lacrymales, salive, urine et selles) uniquement 24 heures après une injection IM de $1,3 \cdot 10^{11}$ à $8,5 \cdot 10^{12}$ vg/kg d'AAVr2 chez des chiens (Herzog *et al.*, 1999). Chez le macaque cynomolgus (injecté en IM avec $5 \cdot 10^8$ à $1 \cdot 10^{10}$ particules infectieuses/kg), du génome AAVr2 a été détecté dans ces mêmes fluides biologiques au plus tard jusqu'à 6 jours post-injection (Favre *et al.*, 2001).

Ainsi, après l'injection d'un vecteur AAVr par voie intramusculaire, même si une grande partie des particules transduisent les cellules musculaires au niveau du site d'injection, une partie non négligeable de particules infectieuses se retrouve dans la circulation sanguine, et a donc la possibilité de transduire d'autres tissus que le muscle injecté. Il est actuellement admis que les études de toxicologie et biodistribution doivent être réalisées avant tout essai clinique (Frederickson *et al.*, 2003). De plus, toute modification de la voie d'administration ou du sérotype nécessite une nouvelle étude toxicologique sur un modèle pré-clinique.

L'expression du produit du transgène dans les cellules autres que les cellules ciblées peut poser un problème de « toxicité » :

- les modifications post-traductionnelles du produit du transgène synthétisé par un tissu ectopique peuvent parfois être différentes de celles de la protéine endogène, augmentant ainsi le risque de déclenchement d'une réponse immune. Ce phénomène dépend du tissu et de la protéine (Arruda *et al.*, 2001b; Lasne *et al.*, 2004).

- La transduction des cellules dendritiques du sang ou de ganglions lymphatiques peut également augmenter les risques d'activation de la réponse immunitaire (Favre *et al.*, 2002; Favre *et al.*, 2001).

L'utilisation d'un promoteur muscle-spécifique, permettant de limiter l'expression du transgène aux cellules musculaires, a été utilisé dans plusieurs études afin d'échapper à la réponse immunitaire observée lorsque le transgène est sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (Cordier *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000; Yoshimura *et al.*, 2004; Yuasa *et al.*, 2002). Toutefois, le promoteur MCK (*muscle creatine kinase*) n'a pas toujours permis d'éviter la réponse humorale contre le produit du transgène, même si son apparition a été fortement retardée (Yuasa *et al.*, 2002). D'autres promoteurs muscle-spécifiques ont également permis un transfert de gène efficace sans réponse immunitaire aigue, comme les promoteurs CK6 et SP6 (Gregorevic *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005). Afin d'obtenir une forte expression du transgène dans le muscle tout en limitant les risques d'activation du système immunitaire, une équipe a synthétisé un promoteur muscle-spécifique hybride, composé de l'enhancer du MCK et du promoteur SV40 (Takeshita *et al.*, 2007). L'électrotransfert dans le muscle de souris du plasmide codant un gène rapporteur sous le contrôle de ce promoteur muscle-spécifique hybride a permis une forte expression du transgène pendant au moins 6 mois, alors que l'électrotransfert du même transgène sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire

tel que le CAG ou CMV n'a entraîné une expression que de quelques semaines (Takeshita *et al.*, 2007).

Dans certaines pathologies telle que la dystrophie, les lésions musculaires sont responsables de l'exacerbation de la réponse immunitaire suite au transfert du gène. En effet, cette maladie entraîne une nécrose des fibres musculaires libérant leur contenu cellulaire dans l'environnement, et est associée à des niveaux très élevés de cellules immunitaires effectrices dans le muscle (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2001). Le déclenchement d'une réponse immunitaire dans les muscles dystrophiques est principalement dû à la cross-présentation d'antigènes du produit du transgène par les fibres nécrotiques aux macrophages et cellules dendritiques, et non pas à la transduction directe de CPA (Sarukhan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000). Ainsi, l'utilisation de promoteurs muscle-spécifiques ne bloque pas toujours totalement le système immunitaire (Cordier *et al.*, 2000; Yuasa *et al.*, 2002).

F. Régulation de l'expression du transgène

Dans l'optique d'applications cliniques ultérieures, la sécrétion d'une protéine à partir de tissus cibles génétiquement modifiés, en comparaison à l'injection de protéine recombinante ou extraite de tissus animaux, présente des avantages notables (en terme de coût et de simplicité du traitement principalement). Toutefois, une régulation est nécessaire pour contrôler et ajuster l'expression du transgène à un niveau thérapeutique afin d'éviter l'apparition d'effets toxiques dus à la surexpression de la protéine. Il faut donc être en mesure de réguler finement la quantité de protéine sécrétée, de manière à maintenir cette quantité dans une fenêtre thérapeutique et à assurer une efficacité biologique optimale. Un système de régulation doit aussi permettre d'arrêter à la demande l'expression du transgène, si l'on veut mettre un terme provisoire ou définitif au traitement. Ceci est encore plus important pour les protéines dont la surexpression peut entraîner des effets secondaires préjudiciables tels que les facteurs neurotrophiques (Johnston *et al.*, 2003; Schlichtenbrede *et al.*, 2003), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Yancopoulos *et al.*, 2000), ou encore le facteur VIIa (Thomas *et al.*, 2007). De plus, comme cela a déjà été mentionné, deux groupes indépendants ont observé, suite à l'injection d'un gène codant l'érythropoïétine autologue, l'apparition d'une anémie auto-immune chez le primate non-humain (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a). C'est pourquoi le transgène doit idéalement être exprimé dans une fenêtre

thérapeutique proche de la quantité physiologique, et seulement pendant la durée nécessaire pour obtenir le phénotype corrigé.

La régulation de l'expression d'un transgène est donc un critère d'efficacité et surtout de sécurité.

Différents systèmes de régulation d'un transgène ont été utilisés *in vivo*. Il existe 2 grands types de systèmes : le système On lorsque la présence d'une drogue active l'expression du transgène, et le système Off lorsque la présence de la drogue inhibe l'expression. Dans la majorité des cas, le système On est préféré : le choix du type de régulation dépend de la maladie à traiter. Les caractéristiques nécessaires pour une application clinique potentielle d'un système de régulation On sont :

- une expression du transgène négligeable en l'absence d'inducteur
- une inductibilité forte, modulable et réversible
- une persistance à long terme de la régulation

Quatre systèmes de régulation (tétracycline, rapamycine, ecdysone et mifépristone) ont été développés pour la régulation *in vivo* de l'expression d'un transgène. Ils sont tous de nature hétérologue et ont en commun l'utilisation d'un inducteur, qui permet soit la formation d'un dimère à partir de deux protéines cellulaires (système rapamycine), soit se fixe sur un transactivateur qui permet l'expression du transgène (systèmes ecdysone, mifépristone et tétracycline). Ces complexes, en se fixant sur des séquences opératrices spécifiques clonées en amont d'un promoteur eucaryote permettent d'activer l'expression du transgène. (pour revue : (Clackson, 2000; Toniatti *et al.*, 2004; Vilaboa and Voellmy, 2006; Weber and Fussenegger, 2006)).

Les systèmes ecdysone (No *et al.*, 1996) et mifépristone (Wang *et al.*, 1994) (Serguera *et al.*, 1999) utilisent un transactivateur constitué du domaine de liaison à l'ADN de l'activateur transcriptionnel Gal-4 fusionné d'une part au domaine de fixation de l'hormone stéroïde utilisée (ecdysone) ou au RU486 (anti-progestérone = mifépristone) et d'autre part au domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex. Ces deux systèmes n'ont été testés que dans des modèles murins et sont pratiquement abandonnés à l'heure actuelle. En effet, la nature des inducteurs propres à ces systèmes et leurs effets secondaires possibles (hormone stéroïde, anti-progestérone) ont limité leur utilisation.

Le système rapamycine (Rivera *et al.*, 1996) utilise le contrôle de la dimérisation de deux protéines chimériques (figure 14). L'une est constituée du domaine de liaison FRB à la rapamycine de la protéine cellulaire humaine FRAP associée au domaine de transactivation p65 du facteur nucléaire NFκB. L'autre est une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine non eucaryote ZFHD1 et de trois domaines de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FKBP12. En présence de rapamycine, ces deux protéines se lient pour former un complexe d'activation de la transcription. La fonction immunosuppressive de la rapamycine a au début limité l'utilisation de ce système. Mais il existe désormais des analogues de la rapamycine efficaces et aux propriétés immunosuppressives moindres (Rivera *et al.*, 2005).

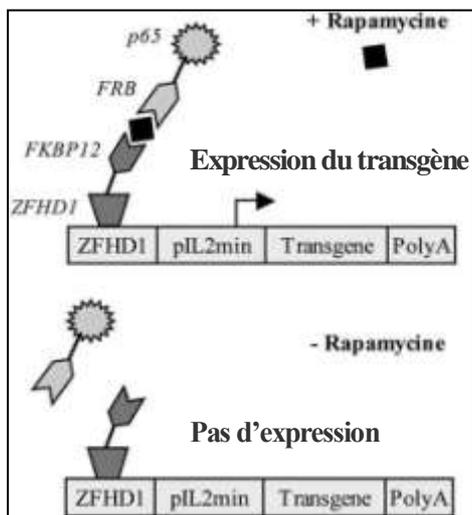


Figure 14 : Représentation schématique du système de régulation Rapamycine

D'après (Le Guiner *et al.*, 2007). Ce système est composé de 2 protéines chimériques, FKBP12-ZFHD1 et FRB-p65. La protéine FKBP12-ZFHD1 est capable d'interagir avec la séquence ADN ZFHD1 fusionnée au promoteur minimal de l'IL-2 (pIL2min). La seconde protéine est soluble. La présence de rapamycine permet la dimérisation de FKBP12 et FRB, formant un transactivateur fonctionnel, et active alors le promoteur pIL2min, engendrant l'expression du transgène. En absence de rapamycine, les domaines FRB et FKBP12 n'interagissent pas ensemble et aucune expression du transgène n'est possible.

Le système Tétracycline a été le plus largement développé *in vivo*. Il fait intervenir comme inducteur la doxycycline (Dox), antibiotique analogue de la tétracycline, dont l'innocuité aux doses utilisées ne fait aucun doute (doses identiques aux doses thérapeutiques). Ce système, développé par Hermann Bujard, repose sur l'utilisation d'un transactivateur qui est soit activé (rtTA pour *reverse tetracycline-controlled Trans-Activator*, système Tet-On) soit inhibé (tTA pour *tetracycline-controlled Trans-Activator*, système Tet-Off) en présence de doxycycline (Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995). Le transactivateur est une protéine chimère d'origine virale et bactérienne. Elle est composée d'un domaine d'activation de la transcription dérivé de la protéine VP16 du virus Herpes Simplex, fusionné à une fraction d'une protéine d'*Escherichia coli* contrôlant sa résistance aux tétracyclines (domaine TetR).

Ce domaine TetR lui permet de se fixer à une séquence opératrice Tet-O clonée en amont d'un promoteur CMV minimal dérivé du cytomégalovirus (CMVmin).

Dans le système Tet-Off (figure 15A) (Folliot *et al.*, 2003; Mizuguchi and Hayakawa, 2002; Rendahl *et al.*, 1998), en l'absence d'inducteur, la protéine tTA se fixe sur la séquence Tet-O avec une très grande affinité et une grande spécificité, induisant l'initiation de la transcription. En présence de doxycycline, le tTA se lie préférentiellement à l'antibiotique, ce qui induit des changements conformationnels et entraîne une baisse de l'affinité du tTA pour les séquences Tet-O et un arrêt de la transcription.

A l'inverse, un système inductible par la Dox (système Tet-On) a été développé quelques années plus tard (figure 15B). En opérant une mutagenèse chimique sur le domaine Tet-R, le groupe d'H. Bujard (Gossen *et al.*, 1995) obtient une version rTet-R qui présente des caractéristiques opposées au Tet-R : elle ne se fixe aux séquences Tet-O avec une forte affinité qu'en présence de Dox. Ainsi, en présence de doxycycline, l'expression du transgène est activée, alors qu'en absence de Dox, il n'y a pas d'expression.

Un troisième système de régulation par les tétracyclines mettant en jeu une autre protéine chimérique composée du domaine TetR d'*E. coli* fusionné au domaine répresseur KRAB du gène humain Kox1 a été documenté *in vitro* (figure 15C) (Deuschle *et al.*, 1995; Herchenroder *et al.*, 1999; Rittner *et al.*, 1997). Comme le système Tet-Off, c'est en l'absence d'inducteur que la protéine chimère se fixe aux séquences opératrices Tet-O, ce qui inhibe l'activité du promoteur grâce au domaine répresseur KRAB. En présence d'inducteur, la protéine TetR-KRAB ne peut plus se fixer à Tet-O ce qui lève la répression du promoteur et active donc la transcription du transgène. Une autre étude a montré que ce système permet de réguler l'expression d'un transgène apporté dans les cellules par un vecteur lentiviral, avec une bonne inductibilité de l'expression du transgène en présence de doxycycline, et sans aucun bruit de fond détectable en son absence (Wiznerowicz and Trono, 2003). Ce système a aussi été utilisé en association avec le système Tet-On pour limiter la fuite d'expression du transgène en absence de Dox (Freundlieb *et al.*, 1999). Il a également été validé chez les rongeurs pour réguler l'expression de petits ARN inhibiteurs (shRNA) (Szulc *et al.*, 2006). Cependant, l'efficacité et l'immunogénicité de ce système doivent être évalués dans les modèles grands animaux.

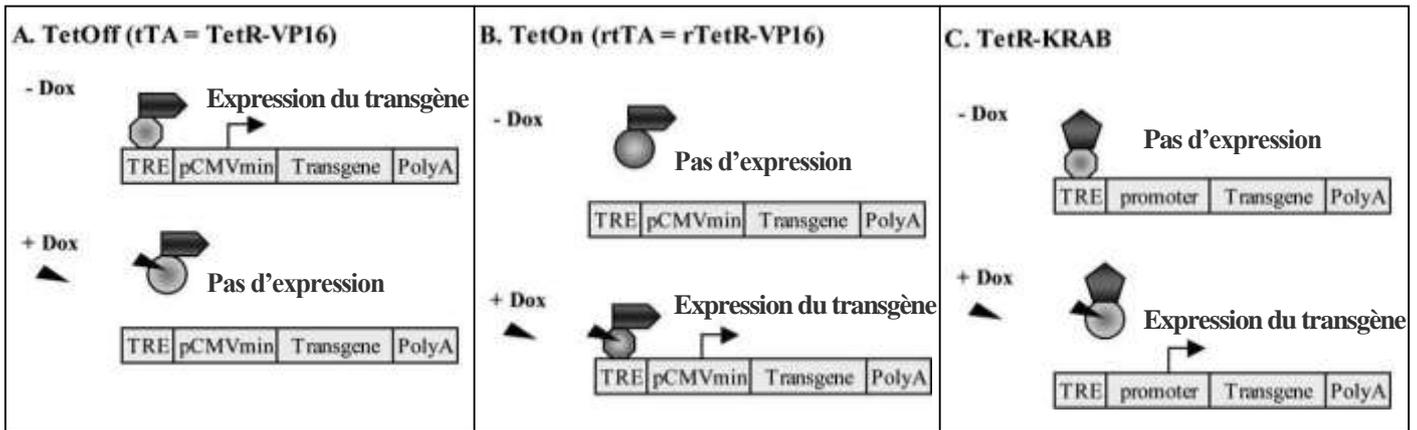


Figure 15 : Représentation schématique des différents systèmes de régulation

Tétracycline

D'après (Le Guiner *et al.*, 2007)

A. Dans le système Tet-Off, la protéine chimérique tTA est composée du domaine de liaison à Tet-O de la protéine bactérienne TetR et du domaine d'activation de la transcription VP16 d'origine virale. En absence de Dox, le tTA se fixe à la séquence Tet-O fusionnée au promoteur CMV minimal, activant ainsi l'expression du transgène. En présence de Dox, le tTA ne peut plus se lier à Tet-O, et aucune expression du transgène n'est observée.

B. Dans le système Tet-On, le transactivateur rtTA est une protéine chimérique, également composée des domaines TetR et VP16, mais 4 mutations dans le TetR font qu'il se lie au Tet-O uniquement en présence de Dox, activant ainsi l'expression du transgène. En absence de Dox, le rtTA ne se lie plus au Tet-O et aucune expression n'est observée.

C. Le transrépresseur chimérique TetR-KRAB est composé du domaine TetR d'*E. coli* (version originale non mutée) fusionné au domaine répresseur KRAB du gène humain Kox1. En absence de Dox, TetR-KRAB se lie au Tet-O et réprime le promoteur empêchant ainsi l'expression du transgène. En présence de Dox, TetR-KRAB n'est plus fixé à Tet-O, et l'expression du transgène cloné sous le contrôle d'un promoteur normal a lieu.

Dox : Doxycycline ; TRE (tetracycline responsive element) : séquence opératrice Tet-O ; pCMVmin : promoteur CMV minimal

Les systèmes rapamycine et Tet-On sont les plus pertinents pour des applications cliniques futures, et ce sont les seuls à avoir été testés dans des modèles grands animaux (Chenuaud *et al.*, 2004b; Favre *et al.*, 2002; Latta-Mahieu *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2005; Stieger *et al.*, 2006; Stieger *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 1999).

Alors que dans les modèles rongeurs le système Tet-On a prouvé son efficacité avec différents vecteurs viraux en terme de régulation et de persistance (Bohl *et al.*, 2000; Bohl *et al.*, 1998; Dejneka *et al.*, 2001; Folliot *et al.*, 2003; Harding *et al.*, 1998; Koponen *et al.*, 2003; Rendahl *et al.*, 1998; Szulc *et al.*, 2006), il a été observé une réponse immunitaire dirigée contre les protéines hétérologues du système de régulation dans le modèle préclinique macaque (Chenuaud *et al.*, 2004b; Favre *et al.*, 2002; Latta-Mahieu *et al.*, 2002). Cette réponse immunitaire, dirigée uniquement contre le transactivateur, et non contre le produit du

transgène, a entraîné la perte totale d'expression du transgène quelques mois seulement après le transfert de gène dans le muscle. Ceci est dû au développement d'une réponse humorale et cellulaire contre le rtTA, aboutissant à la destruction des fibres musculaires transduites (Favre *et al.*, 2002; Latta-Mahieu *et al.*, 2002). De telles réponses immunes ont également été observées avec l'utilisation des variants S2 et M2 du rtTA (Chenuaud *et al.*, données non publiées). Ces variants sont caractérisés par de larges délétions dans le domaine d'activation d'origine viral VP16 : celles-ci les rendent potentiellement moins immunogènes, et leur confèrent une activité transcriptionnelle *in vitro* plus réduite en absence d'inducteur due à une affinité moindre du transactivateur pour la séquence opératrice TetO en absence de doxycycline (Urlinger *et al.*, 2000). De plus, les auteurs avaient émis comme hypothèse que le fait d'éviter l'expression du transactivateur dans les cellules immunitaires telles que les CPA grâce à un promoteur muscle-spécifique empêcherait l'activation du système immunitaire contre le rtTA. Malheureusement, l'utilisation du promoteur Desmine n'a pas non plus inhibé le développement de la réponse immune anti-rtTA (Chenuaud *et al.*, données non publiées).

G. Devenir du génome viral dans les cellules musculaires

Après la conversion du génome simple brin de l'AAVr en ADN double brin, le génome du vecteur est concatémérisé (Fisher *et al.*, 1997; Snyder *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1996) et circularisé (Choi *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 1999b; Duan *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1997; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Ces processus ont été bien décrits *in vivo*. Dans le muscle squelettique de rongeurs, le génome des vecteurs AAV est principalement sous forme extrachromosomique (Schnepp *et al.*, 2003; Schnepp *et al.*, 2005) : ces formes seraient responsables de l'expression du transgène dans ce tissu. De nombreuses équipes font état de concatémères d'orientation tête-queue prédominante (Herzog *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2001; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Le génome AAVr a également été détecté sous forme circulaire chez l'homme ayant reçu un vecteur AAVr codant la protéine FIX par voie intramusculaire (Manno *et al.*, 2003). Une récente étude chez le macaque a montré que le génome de vecteurs AAVr1 et AAVr8, comme pour l'AAVr2, persiste sous forme de monomères et concatémères circulaires épisomiques. De plus, la majorité des génomes persistants sont maintenus dans une configuration proche de celle de la chromatine, ce qui contribue à l'expression à long terme du transgène (Penaud-Budloo *et al.*, 2008). L'association d'histones aux génomes AAVr pourrait expliquer la persistance à long terme des épisomes et l'expression du transgène dans les tissus quiescents.

Il n'y a à l'heure actuelle aucune évidence d'intégration de l'AAVr après transfert dans le muscle squelettique. Tout du moins, le rendement d'intégration serait en dessous du niveau de sensibilité de la méthode utilisée (Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2003; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Ceci est différent de ce qui est retrouvé dans le foie *in vivo*, où le vecteur rAAV peut s'intégrer au génome des cellules-hôtes (Donsante *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2003b; Nakai *et al.*, 2005b), même si le génome du vecteur se retrouve très majoritairement sous forme extrachromosomique (0,05% de cellules hépatiques transduites présentent un événement d'intégration), forme qui est principalement responsable de la stabilité de transduction du foie (Nakai *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 2008)

Plusieurs études ont observé que, plusieurs semaines après transfert de gène dans le muscle squelettique, la quantité de génomes AAVr diminue (Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2005; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003b). Les mécanismes responsables de cette baisse d'expression n'ont pas encore été précisément déterminés. Un certain nombre d'hypothèses ont été émises : extinction du promoteur, dégradation du virion par le protéasome après leur entrée dans la cellule-hôte (Douar *et al.*, 2001), renouvellement des fibres musculaires transduites, et réaction immunitaire contre le vecteur ou le transgène. Une réadministration du vecteur pourrait être nécessaire dans des intervalles de plusieurs années afin que la protéine thérapeutique soit produite en quantité suffisante pour corriger le phénotype malade.

H. Essais cliniques en cours dans le muscle

Actuellement, les essais cliniques en cours de phase I/II ayant pour cible le tissu musculaire utilisent la voie intramusculaire pour administrer le vecteur AAV chez les patients malades.

1. Les maladies métaboliques

a. L'hémophilie B

L'hémophilie B est une maladie récessive liée au chromosome X causée par des mutations dans le gène codant le facteur de coagulation IX. La fréquence de cette maladie à la naissance est 1/30 000 garçons. Les formes sévères de la maladie (moins de 1% de FIX circulant) sont associées à des hémorragies spontanées et des saignements prolongés suite à un traumatisme

ou une chirurgie. Une augmentation de la concentration sérique en facteur IX correspondant à 5% du taux normal permet une nette amélioration des symptômes (Ljung, 1998; Lofqvist *et al.*, 1997). Le traitement actuel repose sur des injections intraveineuses répétées de protéines FIX recombinantes tout au long de la vie du patient. Les inconvénients majeurs d'un tel traitement sont la gêne occasionnée au patient, le risque non négligeable d'infection au niveau du cathéter nécessaire à chaque administration de la protéine, ainsi que le coût.

Le transfert de gène au moyen d'un AAVr codant le FIX a permis une correction à long terme du phénotype dans un modèle de chien hémophile après injection intramusculaire (Herzog *et al.*, 1999). Bien que le FIX soit physiologiquement synthétisé par les hépatocytes, les fibres musculaires sont également capables de produire une protéine FIX biologiquement active après transfert de gène (Arruda *et al.*, 2001b; Herzog *et al.*, 1999). La stratégie de transfert de gène dans le muscle semble plus sûre et moins invasive par rapport à la voie hépatique, même si la voie intramusculaire augmente les risques de déclenchement d'une réponse immunitaire contre le produit du transgène (Herzog and Dobrzynski, 2004).

Un essai clinique de phase I a été publié (ADNc sous le contrôle du promoteur CMV dans un contexte AAVr2, par voie intramusculaire) (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003). Des adultes atteints d'hémophilie B sévère présentant une mutation faux sens ont reçu de multiples injections intramusculaires d'AAVr2-FIX. Chaque patient a reçu des doses différentes de vecteur AAV2 variant entre $2 \cdot 10^{11}$ particules /kg à $1,8 \cdot 10^{12}$ particules par kg. Le transfert de gène a été efficace chez tous les patients, avec une persistance à long terme de l'expression du transgène (Jiang *et al.*, 2006c; Manno *et al.*, 2003). Cependant, quelle que soit la dose de vecteur, la concentration en FIX était inférieure au seuil thérapeutique (< 1%). Seul un patient a présenté des taux de FIX supérieurs à 1% (1,4%) 12 semaines post-injection, mais ce taux est redescendu sous la barre des 1% par la suite. Il faut noter qu'aucun des patients n'a développé de réponse immunitaire contre le FIX.

Ainsi, les résultats obtenus chez l'animal ne sont pas reproduits chez l'homme. L'utilisation de sérotypes alternatifs (comme l'AAVr1) (Arruda *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2000), une augmentation de la dose de vecteur injectée (mais ceci entraînerait un nombre considérable d'injections IM pour un même patient), l'utilisation d'un promoteur plus puissant dans les cellules musculaires, ou encore une administration vasculaire du vecteur sont étudiées afin d'améliorer cette stratégie de traitement (Arruda *et al.*, 2005; Manno *et al.*, 2006; Warrington and Herzog, 2006).

b. Déficit en alpha1-antitrypsine (AAT)

Le déficit en alpha1-antitrypsine (AAT) est une maladie génétique récessive rare, chronique et progressive qui provoque des problèmes pulmonaires et/ou hépatiques. L'AAT est une protéine sanguine synthétisée par le foie. Elle est présente en grande quantité dans l'organisme et son taux dans le sang peut être multiplié par 3 ou 4 au cours des infections et agressions pulmonaires diverses. Son rôle est de protéger l'organisme contre des enzymes (protéases) libérées par certaines cellules immunitaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages) au cours des processus inflammatoires. Lorsqu'il y a un déficit en AAT, les taux de protéases, et particulièrement l'élastase, augmentent et entraînent la destruction du support de l'élasticité du tissu pulmonaire conduisant à l'apparition de l'emphysème génétique (Crystal, 1991).

Il n'existe pour le moment aucun traitement curatif. Seuls des traitements permettant une meilleure fonction respiratoire permettent de retarder la greffe pulmonaire.

Les expérimentations chez la souris ont montré que la production d'AAT par le muscle à l'aide d'un AAVr2 était possible et efficace chez la souris (Song *et al.*, 1998) : ce transfert de gène a permis une expression stable et à long terme d'AAT à des taux thérapeutiques chez la souris, après une unique injection intramusculaire.

Un essai clinique de phase I concernant ces déficits en alpha1-antitrypsine a alors été réalisé chez 12 patients (ADNc sous le contrôle du promoteur CAG dans un contexte AAV-2, par voie intramusculaire) (Brantly *et al.*, 2006; Flotte *et al.*, 2004).

Quatre groupes de 3 individus ont reçu en 3 injections intramusculaires différentes doses de vecteur, allant de $2,1 \cdot 10^{12}$ vg à $6,9 \cdot 10^{13}$ vg. Il n'y a eu aucun effet indésirable observé en relation avec le vecteur. Aucune réponse immunitaire n'a été rapportée suite à l'injection du vecteur, excepté l'augmentation des anticorps anti-AAV2 pré-existants. Cependant, aucune expression d'AAT n'a été détectée chez ces patients, sauf chez un des individus qui a présenté une expression transitoire du transgène à des taux de 80nM (inférieur au seuil thérapeutique). Le génome du vecteur a été retrouvé entre 1 et 3 jours post-injection dans le sérum de tous les patients ayant reçu au moins $6,9 \cdot 10^{13}$ particules totales.

Cet essai aura tout de même permis de démontrer que l'injection d'AAVr2-AAT est non toxique pour les patients (Brantly *et al.*, 2006). Une étude chez la souris utilisant le sérotype 1 ont permis d'atteindre des forts taux d'expression d'AAT avec des quantités moindres de

vecteur (Lu *et al.*, 2006). Une étude de biodistribution et de toxicité de ce transfert de gène à l'aide d'AAVr1-AAT chez la souris et la lapin a également été réalisée (Flotte *et al.*, 2007). Un nouvel essai clinique chez des patients atteints de déficit en AAT est en cours, avec cette fois-ci un AAVr de sérotype 1, plus efficace pour transduire les cellules musculaires que l'AAVr2.

c. Déficit en lipoprotéine lipase (LPL)

Le déficit en lipoprotéine lipase (LPL) est responsable d'une maladie génétique récessive rare (incidence de $1/10^6$) du métabolisme des triglycérides. Elle est caractérisée par une hyperchylomicronémie dont la complication majeure - et souvent fatale - est représentée par les pancréatites aiguës récidivantes ou subaiguës à rechutes (Brunzell and Deeb, 2001).

Le traitement actuel est uniquement diététique et repose sur un régime très pauvre en lipides, afin que le taux de triglycérides dans le sang reste inférieur à 10mmol/L (taux élevé par rapport à la normal, mais non dangereux). Le but étant d'éviter toute crise de pancréatite aiguë (Brunzell and Deeb, 2001).

Le transfert d'un AAVr1 codant le LPL^{S447X} dans un modèle murin de déficit en LPL (souris LPL -/-) a permis une expression à long terme de taux thérapeutiques de LPL après une unique injection IM, avec une correction pratiquement complète de la dyslipidémie (Ross *et al.*, 2004). Ce même vecteur a ensuite été évalué dans un modèle de chat LPL -/-. Ces chats ont une absence totale de protéine LPL et aucune activité enzymatique n'est détectée. Les symptômes sont équivalents à ceux observés dans la maladie humaine. Ce transfert de gène a également permis la correction du phénotype des chats après une unique administration par IM du vecteur AAVr1-LPL^{S447X} (Ross *et al.*, 2006).

Suite à ces résultats encourageant, un essai clinique de phase I/II concernant ces déficits en lipoprotéine lipase est actuellement en cours (ADNc sous le contrôle du promoteur CMV dans un contexte AAVr1, par voie intramusculaire)

Des premiers résultats de cet essai ont été présentés aux congrès ASGT et ESGCT de 2007 et 2008 (Mingozzi *et al.*, 2007c; Mingozzi *et al.*, 2007d; Mingozzi *et al.*, 2008; Nierman *et al.*, 2007).

Huit patients atteints de déficit en LPL ont reçu 1.10^{11} ou 3.10^{11} vg/kg du vecteur AAVr1-LPL, par voie intramusculaire. L'injection du vecteur a été très bien tolérée à ces doses et n'a

montré aucune toxicité aiguë. Chez la plupart des patients, il a été observé une baisse du taux de triglycérides sériques en dessous de la valeur espérée de 10mmol/L, corrélée à l'expression de LPL fonctionnelle dans le muscle injecté à 26-32 semaines post-injection. Ceci montre une expression à long terme de la protéine thérapeutique chez ces patients.

Cependant, un des patients ayant reçu la plus forte dose et répondant bien au départ au traitement, a présenté une élévation transitoire des enzymes CPK entre 4 et 10 semaines post-injection associée à la perte de l'efficacité thérapeutique. Il a été montré la présence d'une réponse cellulaire développée contre la capsid AAV1 entre 4 et 12 semaines post-injection, Aucune réponse humorale contre la protéine LPL n'a été rapportée, ce qui était attendu puisque les patients recrutés étaient tous porteurs d'une mutation non-sens. Parmi tous les patients de cet essai clinique, un autre ayant reçu la forte dose de vecteur, ainsi que deux patients du groupe ayant reçu la faible dose ont montré une réponse positive *in vitro* (par ELISPOT) aux peptides de la capsid du vecteur AAV1.

Ainsi, l'immunité cellulaire (LT CD8⁺) dirigée contre la capsid des vecteurs AAV observée chez l'homme peut être activée par différents sérotypes (AAVr2 et AAVr1) et dans plusieurs tissus cibles (foie et muscle) (Mingozzi *et al.*, 2007b).

Un second essai clinique de phase II est également en cours. Le vecteur utilisé est le même que l'essai précédent (produit en système baculovirus au lieu d'une transfection de cellules HEK293). De plus, pour tenter d'inhiber la réponse T cytotoxique contre la capsid AAVr1 observée dans l'essai clinique précédent, 12 patients sur les 14 de cet essai ont reçu un traitement immunosuppresseur court au moment de l'injection IM du vecteur AAVr1-LPL (Gaudet *et al.*, 2008).

2. Les dystrophies musculaires

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, *Duchenne muscular dystrophy*) est une maladie récessive liée à l'X, due à une mutation dans la séquence codante de la dystrophine. Le gène de la dystrophine fait partie des gènes les plus grands connus à l'heure actuelle, avec 2,4 millions de paires de bases (Ahn and Kunkel, 1993). La DMD touche un garçon nouveau-né sur 3500. L'absence de dystrophine entraîne l'installation progressive de la dégénérescence et de la faiblesse de l'ensemble des muscles de l'organisme, y compris les muscles respiratoires et cardiaques. La dystrophie musculaire de Becker (BMD) est une forme atténuée. L'atteinte est plus ou moins sévère selon que le cadre de lecture de la dystrophine

est maintenu (BMD) ou interrompu (DMD). Actuellement, aucun traitement ne permet de guérir la myopathie de Duchenne. On peut uniquement ralentir son l'évolution grâce à une prise en charge pluridisciplinaire (orthopédique, respiratoire, cardiaque, nutritionnelle, etc.). Ainsi, les enfants atteints ont une espérance de vie de 20 à 30 ans (Evans and Goynes, 1991).

La myopathie des ceintures (LGMD pour *Limb-girdle muscular dystrophy*) est quant à elle une atteinte des sous-unités sarcoglycan α , β , γ ou δ (LGMD 2D, 2E, 2C et 2F respectivement) (Guglieri *et al.*, 2008).

L'utilisation de modèles murins de dystrophie de Duchenne ou de myopathie des ceintures montre qu'il est possible d'obtenir une correction phénotypique après injection d'AAVr2 dans les stades précoces de la maladie. Les animaux utilisés sont des animaux transgéniques présentant une mutation dans la séquence codante de la dystrophine (souris mdx (Fabb *et al.*, 2002; Ferrer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000; Watchko *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2002) ou d'une ou plusieurs sous-unités sarcoglycan (souris *gsg* $-/-$ (Cordier *et al.*, 2000), souris KO pour l' α - ou le β -sarcoglycan (Dressman *et al.*, 2002).

La dystrophine étant une protéine de grande taille, codée par un ADN complémentaire de 14 kb, cet ADNc ne peut pas être utilisé tel quel dans un vecteur de type AAV puisque sa capacité d'encapsulation est limitée à 4,8 kb. Plusieurs groupes ont donc évalué l'efficacité de séquences codantes réduites (Fabb *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Watchko *et al.*, 2002; Yuasa *et al.*, 2002). Ces mini- ou micro-dystrophines sont fonctionnelles *in vivo*. Administrées à des souris de 10 à 12 jours (avant l'apparition de la maladie à 3 semaines), ces constructions permettent une restauration de la dystrophine et des α , β et γ -sarcoglycans 3 à 5 mois après injection.

Des essais cliniques de phase I concernant la DMD ou la LGMD sont en cours, par injections intramusculaires d'AAVr (AAVr5-mini-dystrophin pour la DMD ; AAVr1-alpha-sarcoglycan pour la LGMD 2D – Mendell *et al.* ; AAVr1-gamma-sarcoglycan pour la LGMD 2C – Herson *et al.*).

CONTEXTE ET
OBJECTIFS
DE LA THESE

Le laboratoire de thérapie génique de Nantes travaille depuis plusieurs années sur l'*Adeno-Associated Virus* en tant que vecteur de thérapie génique. L'AAV recombinant est un vecteur particulièrement attractif pour le transfert de gène : il est non pathogène, capable de transduire des cellules quiescentes, et peut permettre une expression stable et à long terme d'un transgène.

Dans le muscle, de nombreuses études réalisées dans différents modèles animaux ont montré qu'un transfert de gène au moyen d'un AAVr permettait de traiter des maladies génétiques monogéniques (Herzog *et al.*, 1999; Le Meur *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2006). Actuellement, de plus en plus d'essais cliniques de thérapie génique utilisant l'AAVr voient le jour. Malheureusement, encore certains problèmes émergent suite à un transfert de gène que ce soit dans les modèles précliniques ou chez l'homme, limitant l'efficacité du transfert de gène à long terme (Favre *et al.*, 2002; Mingozzi *et al.*, 2007d).

Il est donc encore nécessaire de chercher à optimiser dans les modèles animaux le transfert de gène au moyen d'un AAV recombinant, et cela dans le but d'obtenir l'expression du transgène thérapeutique à long terme, en limitant au maximum les effets indésirables chez l'individu traité. D'autre part, pour certaines applications cliniques, il est également nécessaire de pouvoir réguler finement l'expression du transgène apporté chez l'individu malade au moyen d'un AAV recombinant, de manière à maintenir la quantité de protéine produite dans une fenêtre thérapeutique. Le laboratoire de thérapie génique de Nantes étudie chez le primate depuis plusieurs années le système de régulation Tet-On, après transfert d'un gène rapporteur dans le muscle squelettique au moyen d'un AAV recombinant.

I. Utilisation d'un gène rapporteur

Par mesure de sécurité, l'optimisation de la technique du transfert de gène est réalisée dans des modèles animaux. Pour plus de facilité, le transgène utilisé peut coder une protéine dont la présence est facilement détectable et quantifiable au cours du temps dans les tissus transduits : il est alors appelé « gène rapporteur ». Le gène rapporteur remplace le gène thérapeutique dans les étapes de mises au point et d'optimisation du transfert de gène.

Un gène rapporteur doit réunir les caractéristiques suivantes :

- Il doit être étranger au génome de l'hôte, ou du moins le produit du transgène doit pouvoir être facilement différenciable des protéines endogènes de l'individu-hôte

- Le produit du transgène doit être facilement et précisément détectable afin de déterminer dans quels tissus il est présent
- Le produit du transgène doit être quantifiable afin de mesurer l'efficacité de transduction selon les tissus cibles

Les principaux gènes rapporteurs utilisés en transfert de gène à l'aide d'AAVr *in vitro* ou chez les rongeurs sont la bêta-galactosidase (enzyme capable d'hydrolyser le X-gal en un composé formant des précipités bleus) et la GFP (protéine naturellement fluorescente sous les UV). L'expression de ces 2 protéines est facilement détectable et quantifiable dans les tissus où elles sont exprimées. Cependant, dans les expérimentations *in vivo*, les animaux doivent être sacrifiés pour observer et quantifier le produit du transgène dans les différents tissus. L'utilisation de ces gènes n'est donc que peu applicable aux modèles grands animaux puisqu'ils ne permettent pas de réaliser un suivi à long terme de l'expression du transgène, en se cantonnant à un nombre restreint d'animaux.

Pour les expérimentations *in vivo* à l'aide d'AAVr, le gène de l'AAT (Chirmule *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001) ou de l'érythropoïétine (Epo) (Bohl *et al.*, 1998; Chenuaud *et al.*, 2004b; Favre *et al.*, 2001; Kessler *et al.*, 1996; McCarty *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 1997; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999) ont été particulièrement utilisés en tant que gènes rapporteurs dans divers modèles animaux.

L'Epo est une protéine soluble et sécrétée dans la circulation sanguine. La taille de son ADNc (600 pb) est compatible avec son encapsidation dans un vecteur AAVr. Sa détection et sa quantification en périphérie sont facilement réalisables par dosage ELISA dans le sérum des animaux, après un simple prélèvement de sang. De plus, une augmentation d'Epo sérique a des conséquences visibles sur la numération-formule sanguine : augmentation de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine, réticulocytose. L'expression du transgène peut donc être suivie régulièrement et à long terme chez le même animal après une simple prise de sang, geste non invasif (Favre *et al.*, 2002).

Ainsi, l'utilisation des gènes rapporteurs permet d'étudier facilement la persistance à long terme, la cinétique d'expression, l'efficacité de transduction et la biodistribution du transgène dans le contexte de vecteurs AAVr. Ces gènes rapporteurs sont également utilisés dans l'amélioration des vecteurs AAVr comme par exemple l'utilisation de divers sérotypes, l'introduction dans la construction d'éléments favorisant la transduction (promoteur, séquence activatrice) ou encore la régulation de l'expression du transgène.

II. Le système de régulation Tet-On

Le laboratoire de thérapie génique de Nantes évalue depuis plusieurs années la possibilité de réguler l'expression du gène de l'érythropoïétine introduit dans l'organisme à l'aide d'un vecteur AAV. Le gène de l'Epo a été utilisé comme gène rapporteur. Les premières études sur ce sujet menées en collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Heard à l'Institut Pasteur en 1998 ont montré que la régulation à long terme du transgène avec le système Tet-On était possible chez la souris (Bohl *et al.*, 1998). Le laboratoire a donc voulu reproduire ces résultats encourageants dans un modèle pré-clinique : le macaque cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Les primates ont reçu par IM un vecteur AAVr codant l'Epo de macaque et pour le transactivateur rtTA (figure 16A). L'évaluation de ce système Tet-On chez le macaque a soulevé plusieurs problèmes qui n'avaient pas été observés dans le modèle murin. En effet, il a été noté une expression à bas bruit du transgène en absence d'inducteur et une perte progressive de la sécrétion d'Epo au cours des inductions successives à la Dox chez 90% des macaques (Favre *et al.*, 2002). Chez tous les animaux, la première induction a entraîné un pic d'expression d'Epo, associé à une réticulocytose et une augmentation de l'hématocrite. Mais, chez 7 animaux sur 8, les inductions suivantes ont montré une diminution progressive de l'expression du transgène (plus de réponse dès la troisième ou quatrième induction) (figure 16B). L'analyse de l'apparition d'anticorps dirigés contre les deux protéines codées par le vecteur (Epo de macaque et rtTA) a mis en évidence une réponse humorale dirigée contre le rtTA (figure 16C). Aucun anticorps anti-Epo n'a été détecté. Des tests ELISPOT IFN- γ utilisant des lymphocytes prélevés dans les ganglions inguinaux drainant les muscles injectés, stimulés par des cellules dendritiques autologues exprimant la partie Tet-R, puis mis en présence de lymphocytes B immortalisés par le virus Herpes papio exprimant ce même épitope ont mis en évidence une réaction spécifique des lymphocytes T face à l'antigène Tet-R. Cette réponse était de plus corrélée à des infiltrats inflammatoires lymphocytaires (CD4 et CD8) et macrophagiques (CD 68) et à une réduction du nombre de copies du vecteur dans le muscle injecté (Favre *et al.*, 2002). Ces résultats ont donc mis en évidence l'induction d'une réponse cellulaire cytotoxique dirigée contre les fibres musculaires transduites.

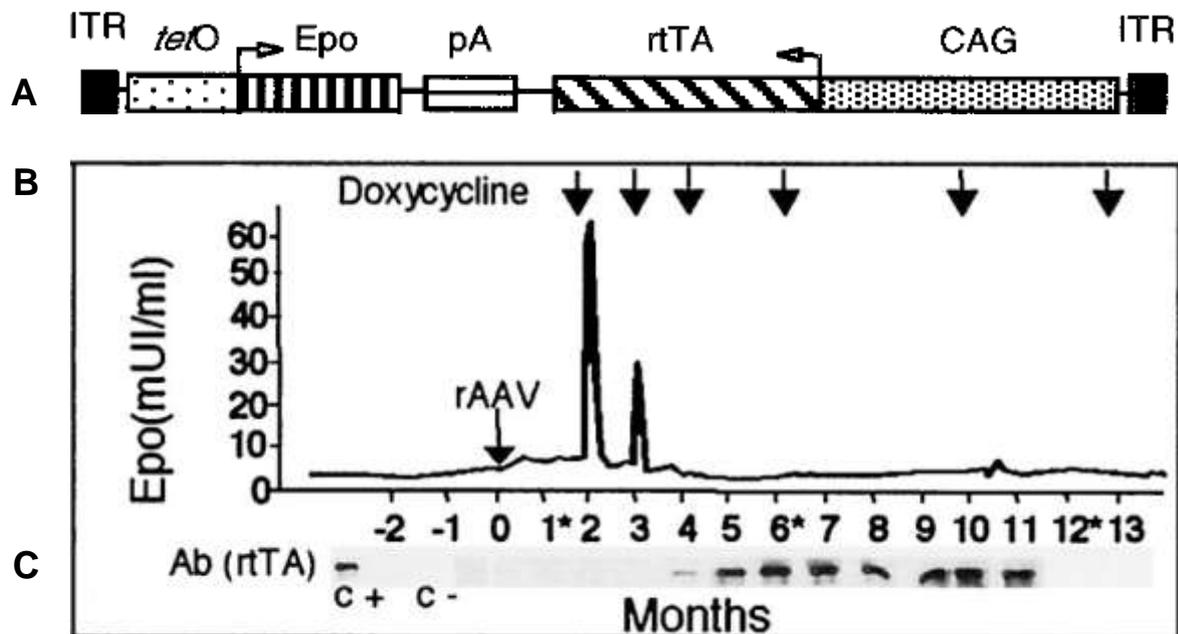


Figure 16 : Modèle de régulation Tet-On développé au laboratoire

D'après (Favre *et al.*, 2002).

A. Plasmide vecteur comportant les 2 cassettes d'expression : la première codant le gène rapporteur Epo sous le contrôle du promoteur CMVmin cloné en aval de la séquence opératrice TetO, la seconde codant le transactivateur rtTA sous le contrôle du promoteur CAG. Le rtTA est donc exprimé constitutivement par les cellules transduites, alors que l'Epo n'est exprimé qu'en présence de Dox.

B. Suivi de l'expression d'Epo (dosage ELISA) chez un macaque ayant reçu 1.10^{10} particules infectieuses d'AAVr-2 en IM au cours d'inductions successives à la Dox (flèches noires).

C. La recherche d'anticorps anti-rtTA dans le sérum des animaux a été réalisée par western-blot tous les mois post-injection.

Les études de Pierre Chenuaud (Chenuaud *et al.*, 2004b) qui ont suivi ont utilisé un promoteur muscle-spécifique (celui de la Desmine humaine) pour l'expression du transactivateur afin de limiter la transduction des CPA (particulièrement des cellules dendritiques). Des variants du rtTA potentiellement moins immunogènes et ayant une activité transcriptionnelle *in vitro* plus réduite en absence d'inducteur ont également été testés (Urlinger *et al.*, 2000). Ces modifications ont permis d'éliminer tout bruit de fond lié à une expression d'Epo en absence de doxycycline chez le macaque. Cependant, le problème de la perte de l'expression du transgène au cours du temps n'a pas été résolu. Des anticorps dirigés contre le rtTA ont de nouveau été retrouvés chez les 8 primates injectés.

Afin d'obtenir une régulation de l'expression d'un transgène efficace et durable dans le temps, un des objectifs de ma thèse a été d'évaluer chez le macaque un autre système de régulation par les tétracyclines (système TetR-KRAB : voir figure 15C p.70), ainsi qu'un protocole d'immunosuppression par la protéine LEA29Y.

III. Objectifs de la thèse

Le système de régulation Tet-on exposé plus haut a montré son efficacité chez la souris. Cependant, chez le macaque, les études menées au laboratoire par David Favre (Favre *et al.*, 2002) et Pierre Chenuaud (Chenuaud *et al.*, 2004b; Le Guiner *et al.*, 2007) ont montré une perte progressive de la sécrétion du transgène (l'Epo de macaque) aux cours des inductions successives à la doxycycline, conséquence d'une réponse humorale et cellulaire dirigée contre le transactivateur rtTA, protéine chimérique intervenant dans le système de régulation.

Un premier objectif de ma thèse a été d'évaluer un autre système de régulation par les tétracyclines dont la protéine chimérique pourrait être moins immunogène que le rtTA. Nous avons donc testé *in vivo* le système de régulation TetR-KRAB (Deuschle *et al.*, 1995) pour la régulation d'un gène rapporteur administré à l'hôte au moyen d'un AAVr.

De plus, comme observé avec le système Tet-On, de nombreuses autres études ont soulevé un problème majeur : un transfert de gène au moyen d'un AAVr, particulièrement dans les modèles grands animaux ainsi que chez l'homme, induit fréquemment le développement d'une réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire, dirigée contre la capsid du vecteur et/ou le produit du transgène. Ces réponses immunitaires ont souvent pour conséquence la perte d'expression de la protéine thérapeutique quelques temps après l'injection.

Nous avons donc également évalué un protocole expérimental d'immunosuppression pour tenter de bloquer la réponse immunitaire développée contre un produit du transgène connu au laboratoire pour être immunogène après transfert de gène dans le muscle à l'aide d'AAVr sur la même cohorte de macaques : le modèle rtTA/Epo (2^{ème} article).

Le dernier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier chez le primate, modèle préclinique pertinent, les facteurs impliqués dans l'activation du système immunitaire après transfert de gène à l'aide d'AAVr. Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux d'entre eux : la nature de la capsid du vecteur AAVr (sérotypage) et la voie d'administration du vecteur. Nous avons ainsi étudié l'impact de ces deux paramètres au niveau efficacité de transduction, sécurité du transfert de gène par l'analyse de la biodistribution du vecteur (1^{er} article), et relation avec le système immunitaire de l'hôte (2^{ème} article).

RESULTATS

I. Evaluation *in vivo* du système de régulation TetR-KRAB

Le système TetR-KRAB a été décrit *in vitro* par Deuschle *et al.* en 1995 (Deuschle *et al.*, 1995). Il met en jeu une protéine chimérique composée du domaine TetR d'*E. coli* fusionné au domaine répresseur KRAB du gène humain Kox1 (voir chapitre IV-F de l'introduction).

A ce jour, ce système a montré qu'il était efficace, tout comme le système Tet-On, chez le rongeur (Szulc *et al.*, 2006). Cependant, son efficacité, et son immunogénicité chez le gros animal en particulier, restent à évaluer après transfert de gène au moyen d'un AAV recombinant.

Nous avons donc testé ce système *in vivo*, dans un contexte AAVr, tout d'abord chez la souris, pour évaluer s'il présente les caractéristiques nécessaires pour une application clinique potentielle : i) une inductibilité forte en présence de doxycycline, modulable et réversible, ii) une expression du transgène négligeable en absence de doxycycline et iii) une persistance à long terme de la régulation, le tout dans un contexte AAVr.

A. Matériels et méthodes

1. Constructions plasmidiques

Les constructions comportent deux cassettes d'expression clonées entre les deux ITR de l'AAV2 : TetO-promoteur-Epo-pA et CAG-TetR-KRAB-pA. La première cassette code l'érythropoïétine murine. Ce transgène a été placé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire cloné en aval de la séquence opératrice TetO. Trois promoteurs différents ont été testés pour le contrôle du transgène: le promoteur CMV (589 pb), un promoteur CMV plus court (335 pb) contenant la fin de l'enhancer et la boîte TATA, et le promoteur humain PGK (phosphoglycérate kinase). La seconde cassette code le transrépresseur TetR-KRAB sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β -actine de poulet fusionné à l'enhancer du promoteur précoce du Cytomégalo virus). Les 2 cassettes ont été clonées soit en orientation « forward » lorsque l'extrémité 5' de la cassette d'expression de l'Epo est clonée en 3' de la cassette d'expression du TetR-KRAB, soit en orientation « opposite » lorsque l'extrémité 3' de l'Epo est clonée en 3' du TetR-KRAB. Le signal de polyadénylation utilisé pour les constructions « opposite » est le pA SV40 qui est bidirectionnel. Le plasmide de départ utilisé pour les constructions provient de P. Chenuaud, Inserm U649, CHU Nantes. Le plasmide

portant la séquence codant le transrépresseur TetR-KRAB nous a été fourni par D. Trono, Université de Genève, Suisse.

Le plasmide rtTA-M2/Epo nous servant de témoin positif a été décrit précédemment (Chenuaud *et al.*, 2004b).

Ces constructions sont schématisées figure 17.

2. Production des AAV recombinants

Les vecteurs AAV1 ont été produits comme décrit précédemment (Chenuaud *et al.*, 2004b), et purifiés par double gradient de chlorure de césium, suivi d'une dialyse. Les différents stocks de vecteurs ont été titrés par dot-blot (Salvetti *et al.*, 1998).

3. Tests de fonctionnalité in vitro

Chaque vecteur a été testé *in vitro* par transduction de cellules HeLa en présence ou absence de doxycycline (2µg/mL). Différentes dilutions des surnageants récoltés 48h post-infection, ainsi qu'une gamme d'Epo recombinante ont été mises en présence de cellules DAE7 dont la croissance, dépendante de la présence d'Epo dans le milieu de culture, a été quantifiée par un test de toxicité au MTT après 48h de culture.

L'analyse par western-blot des culots cellulaires des cellules infectées a été réalisée pour évaluer l'expression des protéines TetR-KRAB ou rtTA par les différents vecteurs. Après dépôt de 25 µL de lysat cellulaire dans chaque puits, puis migration sur gel SDS-Page 12% de polyacrylamide, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose. Après saturation, la membrane a été incubée avec un anticorps anti-TetR (donné par H. Bujard) dilué au 1/1000 pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs lavages, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase dilué au 1/5000 pendant 30 minutes à température ambiante. La révélation a été effectuée à l'aide du kit ECL (Amersham).

4. Expérimentation animale

70 souris mâles C57BL/6 de 10 semaines ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de xylazine et kétamine (7 et 70 mg/kg respectivement). 30 µL de vecteur AAV1 dilués dans du PBS (*Phosphate buffered saline*) ont été injectés dans le muscle tibial crânial droit de

chaque souris (10 souris par vecteur). Chaque animal a reçu 3.10^9 particules d'AAV1. Dix souris supplémentaires n'ont reçu aucune injection et ont servi de témoins négatifs.

La doxycycline (Ronaxan PS 5%, Merial) a été dissoute dans l'eau de boisson à une concentration finale de 250 µg/mL avec 5% de sucrose (Sigma) pendant les périodes d'induction.

5. Mesure de l'Ht et dosage de l'Epo sérique

Les prélèvements de sang ont été réalisés par ponction au sinus rétro-orbital des animaux sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Dix µL ont été prélevés toutes les semaines pour mesure de l'hématocrite, à l'aide de micro-capillaires héparinés. Des échantillons de 300 µL de sang ont été prélevés sur tube sec au début et à la fin de chaque cycle d'induction à la Dox pour déterminer la concentration d'Epo dans le sérum des animaux. L'Epo sérique a été dosée par ELISA (kit R&D Systems) selon les recommandations du fabricant. La courbe standard a été réalisée avec différentes dilutions d'Epo murine allant de 3000 pg/mL à 47 pg/mL. Les échantillons de sérum des animaux étant dilués au 1/2, le seuil de sensibilité d'Epo dans les échantillons était donc de 100 pg/mL.

B. Résultats

1. Construction du vecteur AAVr

Nous avons construit des vecteurs AAVr comportant deux cassettes d'expression : la première codant l'érythropoïétine murine sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, et la seconde codant le transrépresseur TetR-KRAB sous le contrôle du promoteur ubiquitaire fort CAG. Le gène de l'Epo a été choisi en tant que gène rapporteur car son expression est facilement quantifiable *in vivo* par mesure de l'hématocrite ou dosage de l'Epo sérique par ELISA.

Ne sachant pas si l'efficacité de la répression par le domaine KRAB pouvait être dépendante de la puissance du promoteur à réprimer, trois promoteurs ont été testés pour le contrôle du transgène Epo : le promoteur CMV dérivé du Cytomégalovirus avec son enhancer et sa boîte TATA, un CMV plus court comportant la fin de l'enhancer et la boîte TATA (CMV court), et le promoteur humain PGK.

Il a également été décrit que le KRAB est capable de réprimer tout promoteur situé jusqu'à 3 kb de son site de fixation (TetO) (Deuschle *et al.*, 1995). C'est pourquoi deux orientations par construction ont été clonées : l'orientation « forward » (FOR) lorsque l'extrémité 5' de la cassette d'expression de l'Epo est clonée en 3' de la cassette d'expression du TetR-KRAB, et l'orientation « opposite » (OPP) lorsque l'extrémité 3' de l'Epo est clonée en 3' du TetR-KRAB (figure 17A et 17B).

Les 6 plasmides vecteurs TetR-KRAB ont ensuite été encapsidés dans des AAVr de sérotype 1 (pseudotype 2/1), puisque c'est un des sérotypes qui permet d'obtenir les plus hauts taux d'expression dans le muscle de souris, de chien et de primate (Arruda *et al.*, 2004; Chenuaud *et al.*, 2004b; Gao *et al.*, 2002). La construction optimale d'expression du transgène Epo sous la régulation Tet-On (rtTA-M2) décrite par Chenuaud *et al.* (Chenuaud *et al.*, 2004b) chez la souris a également été encapsidée dans un vecteur de sérotype 1 et a servi de témoin positif pour nos expérimentations *in vivo* (figure 17C).

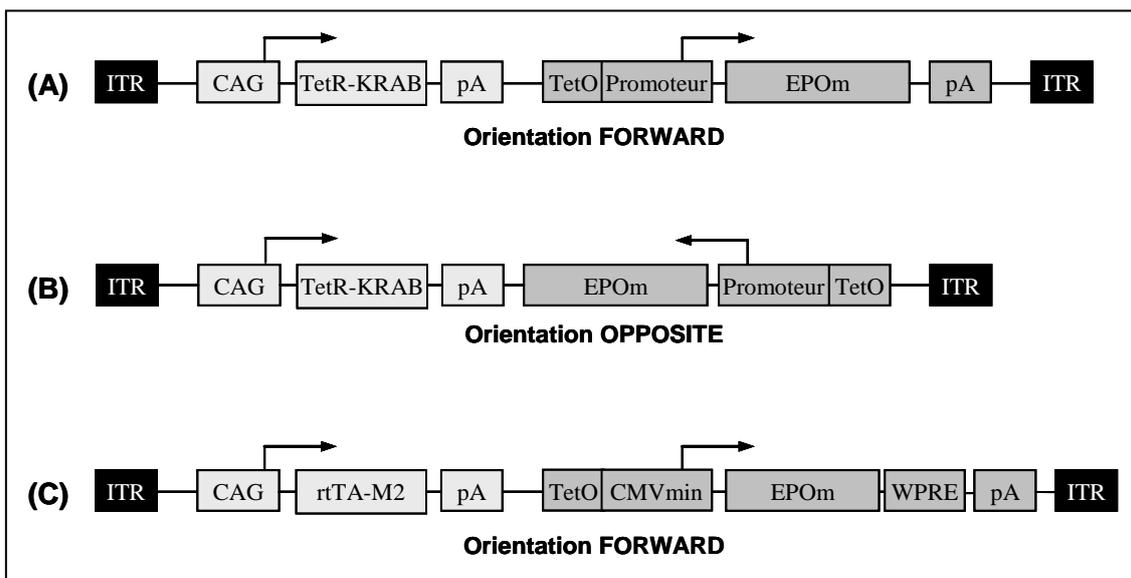


Figure 17 : Structure des plasmides AAV-Epo/TetR-KRAB et AAV-Epo/rtTA

(A) et (B) : Plasmides vecteurs codant l'Epo murine sous le contrôle de différents promoteurs (CMV, CMV court et PGK humain clonés en aval des séquences opératrices TetO) et pour la protéine TetR-KRAB sous le contrôle du promoteur CAG. Deux orientations par promoteur ont été testées : (A) orientation « forward » lorsque l'extrémité 5' de la cassette d'expression de l'Epo est clonée en 3' de la cassette d'expression du TetR-KRAB – (B) orientation « opposite » lorsque l'extrémité 3' de l'Epo est clonée en 3' du TetR-KRAB.

(C) Plasmide vecteur codant l'Epo murine sous le contrôle du promoteur CMVmin cloné en aval de TetO, et pour le transactivateur rtTA-M2 sous le contrôle du promoteur CAG, en orientation forward (plasmide décrit dans (Chenuaud *et al.*, 2004b)).

ITR, inverted terminal repeat. pA, signal de polyadénylation. WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

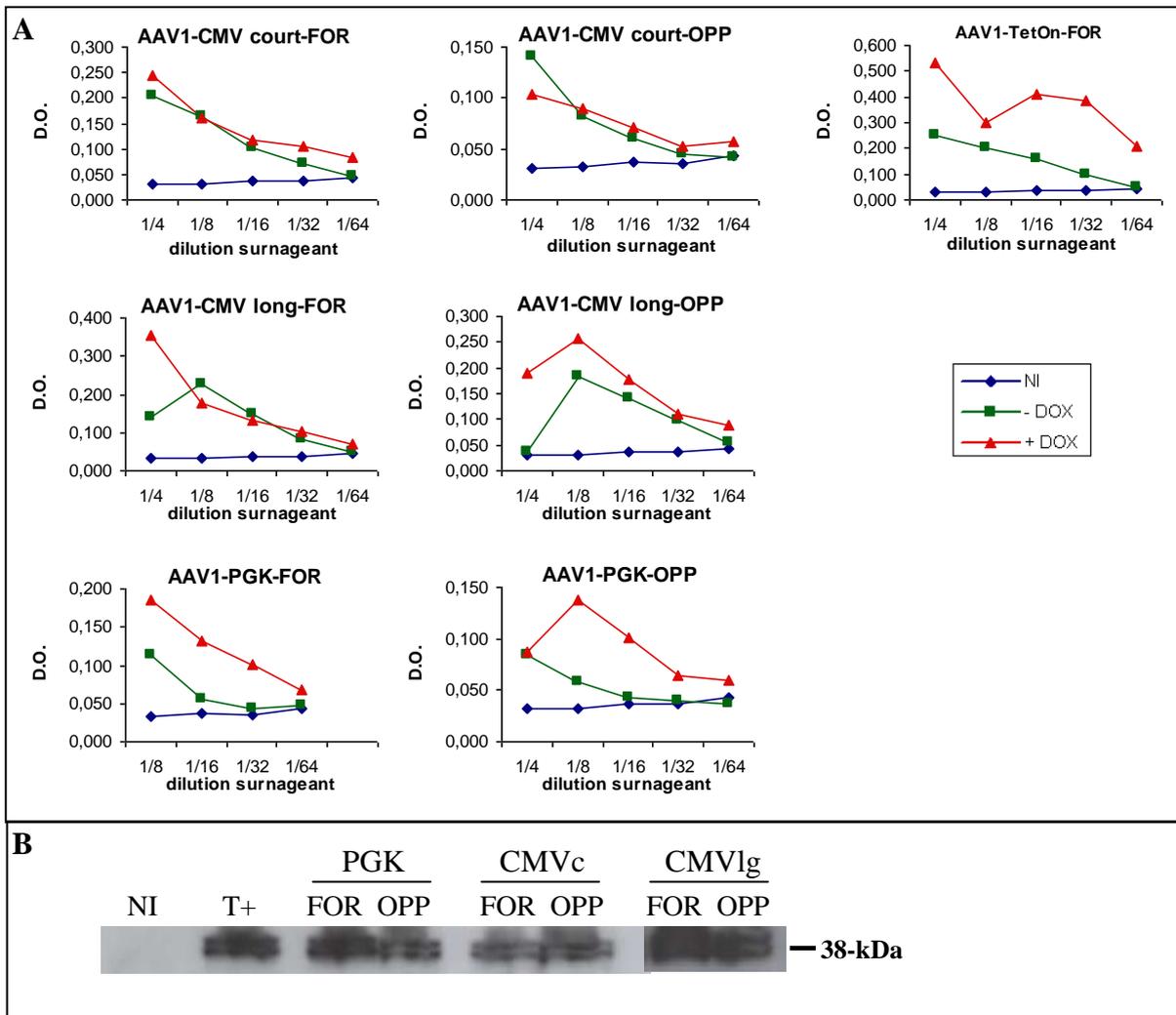


Figure 18 : Test de fonctionnalité *in vitro* des vecteurs AAVr1-TetR-KRAB

A. Après infection de cellules HeLa avec les différents vecteurs AAVr1, la présence d'Epo a été recherchée dans les surnageants par un test de toxicité au MTT sur cellules DEA7 Epo-dépendantes.

NI : surnageant de cellules non infectées ; + DOX : infection en présence de Dox dans le milieu de culture ; - DOX : infection en absence de Dox dans le milieu de culture.

B. Détection de protéines TetR-KRAB dans le culot cellulaire de HeLa infectées avec les différents vecteurs AAVr1 par WB (anticorps primaire anti-TetR). NI : cellules non infectées (témoin négatif) ; T+ : cellules transfectées avec un plasmide exprimant le TetR-KRAB

2. Validation *in vitro*

Chaque préparation de vecteur AAV a été validée *in vitro* avant injection aux souris. Des cellules HeLa ont été transduites avec les différents vecteurs en présence ou absence de doxycycline pendant 48h. La présence et la fonctionnalité de l'Epo produite à partir de ces 7 vecteurs a été vérifiée par un test de toxicité sur des cellules DAE7 dont la croissance est dépendante de la quantité d'Epo présente dans leur milieu de culture (figure 18A). Les

protéines TetR-KRAB et rtTA ont également été recherchées dans le surnageant par western-blot avec un anticorps anti-TetR (figure 18B).

Tous les vecteurs AAVr-1 ont permis l'expression d'Epo fonctionnelle et des protéines TetR-KRAB ou rtTA par les cellules transduites en présence de doxycycline (figure 18). En absence d'inducteur, une expression d'Epo est également détectée, pour tous les vecteurs.

Ces vecteurs sont fonctionnels et ont été administrés aux animaux.

3. Suivi de l'expression du transgène *in vivo*

Chacun des 6 vecteurs AAVr1-Epo/TetR-KRAB a été injecté par IM chez 10 souris à la dose de $3 \cdot 10^9$ vg/animal. Un 7^{ème} groupe de 10 souris a reçu par le même protocole $3 \cdot 10^9$ vg de la construction AAVr1-Epo/rtTA (témoin positif), et un 8^{ème} groupe n'a reçu aucune injection (témoin négatif).

L'hématocrite (Ht) de chaque souris a été mesurée toutes les semaines afin de suivre la cinétique d'expression du transgène Epo. Un mois post-injection, la moitié des souris de chaque groupe a reçu un traitement à la doxycycline dans l'eau de boisson, jusqu'à stabilisation de leur Ht (4 à 10 semaines selon les groupes). Une fois l'Ht stabilisée, le taux d'Epo sérique a été dosé par ELISA avant l'arrêt du traitement à la doxycycline, et les 5 autres souris du groupe ont, à leur tour, été induites à la Dox.

Tous les groupes ont été suivis sur au moins une induction (12 semaines minimum). Le dosage d'Epo sérique a été réalisé pour les 10 souris de chaque groupe avant transfert de gène, et à la fin des inductions de chaque sous-groupe (figure 19).

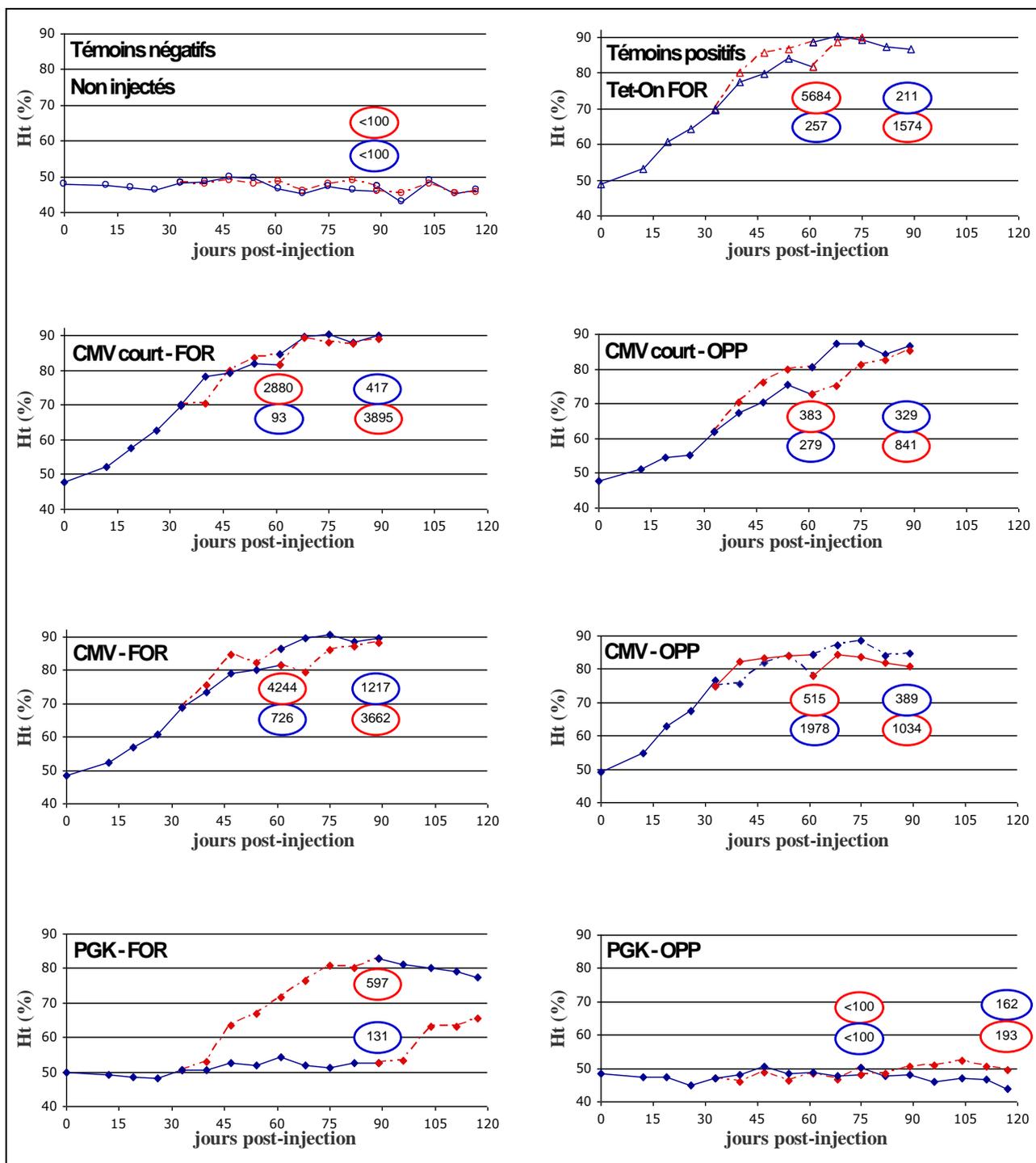


Figure 19 : Suivi de l'hématocrite et de l'Epo sérique des souris injectées

Chaque souris a reçu en IM 3.10^9 particules d'AAVr1.

Tet-On FOR : souris ayant reçu l'AAV1-CMVmin-EPO/rtTA en orientation forward.

CMV court - FOR : souris ayant reçu l'AAVr1-CMVcourt-EPO/TetR-KRAB en orientation forward.

CMV court - OPP : souris ayant reçu l'AAVr1-CMVcourt-EPO/TetR-KRAB en orientation opposée.

CMV - FOR : souris ayant reçu l'AAVr1-CMV-EPO/TetR-KRAB en orientation forward.

CMV - OPP : souris ayant reçu l'AAVr1-CMV-EPO/TetR-KRAB en orientation opposée.

PGK - FOR : souris ayant reçu l'AAVr1-PGK-EPO/TetR-KRAB en orientation forward.

PGK - OPP : souris ayant reçu l'AAVr1-PGK-EPO/TetR-KRAB en orientation opposée.

Chaque courbe représente la moyenne des hématocrites (Ht) de chaque demi-groupe (n=5). L'Ht a été mesurée toutes les semaines, et la doxycycline (250 µg/mL) était présente (en rouge) ou non (en bleu) dans leur eau de boisson. La moyenne des concentrations d'Epo sérique (en pg/mL) de chaque demi-groupe est représentée dans un cercle (rouge si les souris étaient sous Dox, bleu sinon) au temps post-injection où elles ont été déterminées. Les concentrations d'Epo avant injection étaient toutes inférieures à 100 pg/mL (seuil de détection de l'ELISA).

Après une première induction à la Dox, nous avons observé une fuite significative d'expression d'Epo en absence d'inducteur pour les groupes CMV et CMV court, quelle que soit l'orientation des 2 cassettes, caractérisée par une forte augmentation de l'Ht. Cette fuite a également été observée pour le groupe témoin positif ayant reçu le vecteur AAV1-Epo/rtTA contrairement aux résultats obtenus par le laboratoire avec la même cassette d'expression encapsidée dans un AAVr2 (Chenuaud *et al.*, 2004b). Le suivi de l'Ht seul ne nous permet donc pas de dire s'il y a eu régulation du transgène ou pas : que les souris soient sous Dox ou non, leur Ht est au plus haut (90%). Les souris du groupe PGK-OPP n'ont montré aucune augmentation significative de leur Ht ou d'Epo, en présence ou non d'inducteur. Et le groupe PGK-FOR a montré une augmentation d'Ht uniquement en présence de Dox.

Pour les souris ayant reçu la construction FOR, la concentration d'Epo sous doxycycline est 3 à 10 fois supérieure comparée à celle des souris non induites. De plus, après arrêt de l'induction, le taux d'Epo sérique redescend au niveau de celui des souris non induites. Le dosage d'Epo sérique nous a donc permis de valider la fonctionnalité de la régulation TetR-KRAB. Cependant, pour les souris ayant reçu une construction OPP, la présence d'une réelle régulation n'est pas nette à la vue des résultats du dosage EPO.

Contrairement aux autres groupes, aucune fuite d'Epo n'est visible en absence d'inducteur chez les souris ayant reçu la construction PGK-FOR. En présence de Dox, une augmentation d'Ht et d'Epo est clairement observée. Ce groupe de souris PGK-FOR a donc été suivi à plus long terme (42 semaines - 2 inductions complètes pour chacun des 2 demi-groupes : figure 20). Après induction à la Dox, 1 à 2 semaines sont nécessaires pour voir l'effet de l'expression d'Epo sur l'Ht. Au bout de 6 à 7 semaines, l'Ht se stabilise (entre 70 et 80% selon les souris). Après arrêt de la Dox, 8 à 10 semaines sont nécessaires pour que l'Ht retrouve son taux basal. Une seconde induction à la Dox entraîne une nouvelle augmentation de l'Ht.

Le système de régulation TetR-KRAB est donc fonctionnel chez la souris après transfert de gène au moyen d'AAVr lorsque le transgène est sous le contrôle du promoteur PGK : il est réversible, présente une fuite d'expression négligeable en absence d'inducteur, et induit de grandes quantités de produit de transgène (6 à 8 fois la valeur physiologique d'Epo chez la souris).

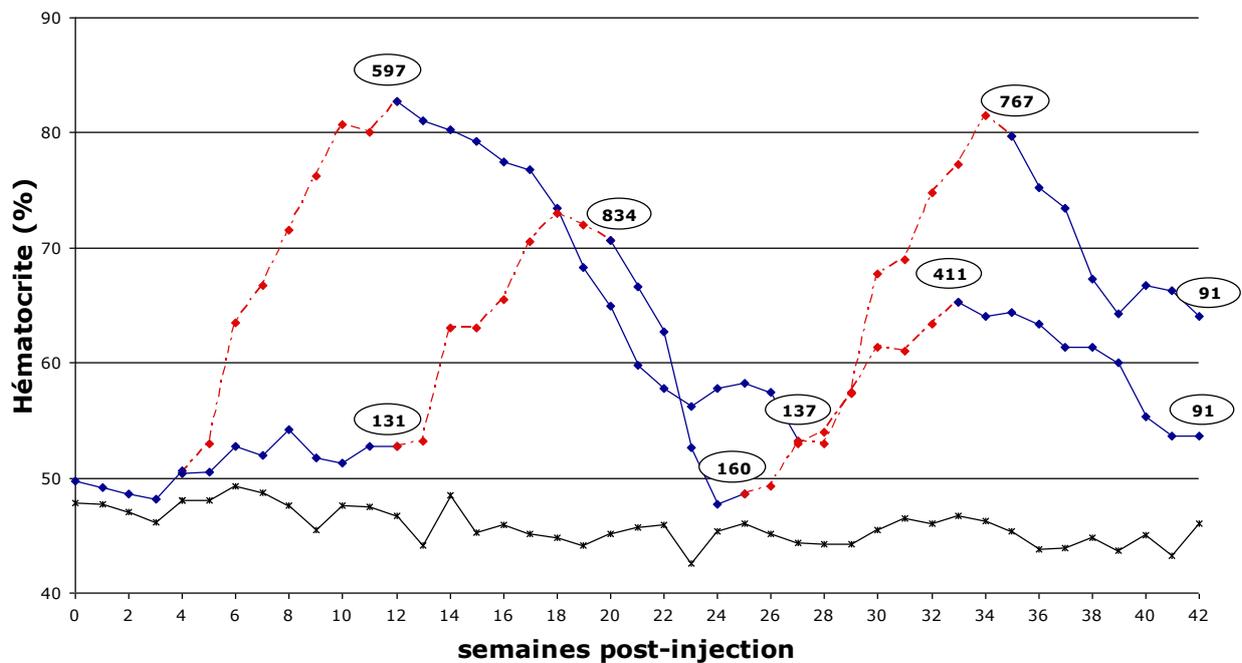


Figure 20 : Suivi de l'Ht et de l'Epo sérique du groupe PGK-FOR

Le groupe ayant reçu le vecteur AAV1-PGK-EPO/TetR-KRAB en orientation forward a été suivi sur 2 inductions complètes à la Dox (42 semaines). L'Ht a été mesurée toutes les semaines, et la doxycycline (250 µg/mL) était présente (en rouge) ou non (en bleu) dans leur eau de boisson (chaque courbe représente la moyenne d'Ht des 5 souris). La moyenne des concentrations d'Epo sérique (en pg/mL) de chaque demi-groupe est représentée dans un cercle au dessous de leur courbe d'Ht, au temps post-injection où elle a été déterminée. Les concentrations d'Epo avant injection étaient toutes inférieures à 100pg/mL (seuil de détection de l'ELISA). La courbe en noir représente la moyenne d'Ht des 10 souris non injectées (témoin négatif).

C. Discussion et perspectives

1. TetR-KRAB est fonctionnel dans un contexte AAVr

L'ensemble des résultats présentés montre une expression d'Epo inductible à la doxycycline et réversible grâce au système de régulation TetR-KRAB après une unique administration d'AAVr par voie intramusculaire chez la souris. L'Epo sécrétée par le muscle est biologiquement active et stimule fortement l'érythropoïèse comme l'atteste l'augmentation du taux d'hématocrite chez les souris injectées.

Le mécanisme par lequel KRAB inhibe l'expression des gènes n'est aujourd'hui pas entièrement connu. Il a été montré que KRAB pouvait inhiber l'expression des ARN polymérase II et III par activation de la formation d'hétérochromatine. Une fois liée à l'ADN, la protéine KRAB recruterait un complexe multimoléculaire qui conduirait à la méthylation de l'ADN et à la déacétylation des histones, ainsi qu'à la fixation de la protéine

HP-1 (*heterochromatin protein 1*) aux histones, favorisant ainsi sur environ 3 kb en amont et en aval la condensation de la chromatine vers l'hétérochromatine, forme transcriptionnellement inactive (Deuschle *et al.*, 1995; Moosmann *et al.*, 1997; Senatore *et al.*, 1999; Urrutia, 2003). C'est pourquoi il était admis que la répression par KRAB ne pouvait fonctionner qu'en système intégratif (Szulc *et al.*, 2006; Wiznerowicz and Trono, 2003). Ce système de régulation par la protéine TetR-KRAB a en effet déjà prouvé son efficacité et sa stabilité *in vitro* et chez le rongeur après intégration au génome des cellules hôtes (vecteur lentiviral) (Szulc *et al.*, 2006; Wiznerowicz and Trono, 2003).

Il était légitime de se demander si ce système pouvait être fonctionnel après transfert de gène dans le muscle au moyen d'un AAVr. D'après de nombreuses études, le génome de l'AAVr persiste dans le noyau des cellules hôte sous forme de concatémères extrachromosomiques d'orientations majoritairement épisomiques, avec à l'heure actuelle aucune preuve d'intégration du génome du vecteur après transfert dans le muscle squelettique (Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2003; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). L'environnement de ces concatémères dans le noyau est cependant sensiblement le même que celui des gènes intégrés : le génome AAVr se retrouve sous une forme ressemblant à la chromatine avec association à des histones (Penaud-Budloo *et al.*, 2008). Ceci pourrait expliquer le fait que KRAB est capable d'exercer sa répression sur des promoteurs portés par une structure épisomale.

2. Fuite d'expression du transgène Epo

Dans cette étude, une forte fuite d'expression d'Epo en absence d'inducteur a été observée avec la construction Tet-On contrairement à ce qui avait été décrit par Chenuaud *et al.* au laboratoire après injection IM de cette même construction encapsidée dans un vecteur de sérotype 2 (Chenuaud *et al.*, 2004b). Dans cette étude antérieure, les souris avaient reçu 2.10^8 particules infectieuses d'AAVr2 correspondant à $4,2.10^{10}$ vg. Dans la littérature, les études ne s'accordent pas sur la différence d'efficacité entre l'AAVr1 et l'AAVr2. La première étude du groupe de Jim Wilson (Xiao *et al.*, 1999) a montré une augmentation de l'expression du transgène d'un facteur 2 à 10 chez la souris (injection de 2.10^{12} vg/kg) alors que les études du groupe de Jude Samulski (Chao *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2001) ont montré une augmentation d'un facteur 100 à 1000 après injection chez la souris de 10^{13} vg/kg d'AAVr-FIX. Des résultats plus récents du groupe de K.High (Arruda *et al.*, 2004) se rapprochent de ceux du groupe de J.Wilson : après injection de 2.10^{11} à 4.10^{12} vg/kg d'AAVr-FIX chez la souris, ils

observent une augmentation du taux FIX d'un facteur 10 à 20. Nous avons choisi d'injecter à nos souris 10 fois moins de vecteur AAVr1 dans le but d'obtenir des taux d'expression similaires à ceux obtenus dans l'étude de Chenuaud *et al.*. Cependant, cette dose de vecteur a permis une transduction bien plus forte que dans l'étude de Chenuaud *et al.*. En effet, même si cela n'est pas visible avec le suivi d'hématocrite, les niveaux d'Epo obtenus sont significativement différents. Après injection IM de $4,2 \cdot 10^{10}$ vg d'AAVr2, le pic d'Epo en présence de Dox atteint en moyenne 86 mU/mL, soit environ 860 pg/mL, alors qu'avec $3 \cdot 10^9$ vg d'AAVr1, la concentration sérique d'Epo est supérieure à 5000 pg/mL. Nous avons donc observé un facteur 50 entre les taux d'expression obtenus avec l'AAVr1, et ceux observés avec l'AAVr2 chez la souris. Le fait que le taux de transduction soit si important dans notre étude peut expliquer la présence d'une forte fuite d'Epo en absence de Dox.

Pour les constructions CMV-FOR et CMVcourt-FOR, nous observons comme pour le groupe Tet-On une très forte expression du transgène dans le sérum (plus de 3000 pg d'Epo/mL). Comme pour la construction Tet-On, cette surexpression d'Epo peut expliquer pourquoi une fuite d'expression est présente en absence d'inducteur, même si la régulation est fonctionnelle chez ces souris comme l'atteste la nette baisse d'Epo sérique après arrêt du traitement à la Dox.

3. Problème rencontré avec certaines constructions

Il semblerait cependant que la régulation avec les constructions en orientation Opposite ne soit pas fonctionnelle. En effet, l'expression d'Epo, que ce soit en présence ou en absence d'inducteur, reste identique, et est du même ordre de grandeur que celle observée dans les groupes FOR en absence de Dox. Cette expression d'Epo peut donc être attribuée à la fuite d'Epo, et signifierait que la présence de Dox ne permet pas de lever la répression du KRAB sur le promoteur contrôlant l'expression d'Epo.

Actuellement, nous ne connaissons pas les raisons qui font que système TetR-KRAB ne fonctionne pas lorsqu'il est porté par des vecteurs dont les 2 cassettes d'expression sont en orientation opposite.

Pour les constructions avec le promoteur PGK, l'expression du transgène est plus faible. En effet, le promoteur PGK est connu pour être plus faible que le CMV. Comme pour les autres constructions en orientation Opposite, le groupe PGK-OPP ne montre aucune

régulation de l'expression d'Epo au cours des inductions à la Dox. L'expression observée est donc celle obtenue en l'absence de Dox dans le groupe PGK-FOR : c'est probablement la raison pour laquelle aucune expression d'Epo n'est détectable. Afin de tout de même vérifier que le transfert de gène a bien eu lieu dans ce groupe, une Q-PCR spécifique de la cassette transférée pourra être envisagée.

4. Comparaison des systèmes TetR-KRAB et Tet-On chez la souris

Pour le groupe PGK-FOR, les taux d'Epo sérique après induction à la Dox sont équivalents à ceux observés avec la construction Tet-On de l'étude de Chenuaud *et al.*. On peut donc comparer l'efficacité des deux systèmes de régulation entre les groupes Tet-On-FOR de l'étude de Chenuaud *et al.*, et le groupe PGK-FOR de ce travail de thèse (figure 21).

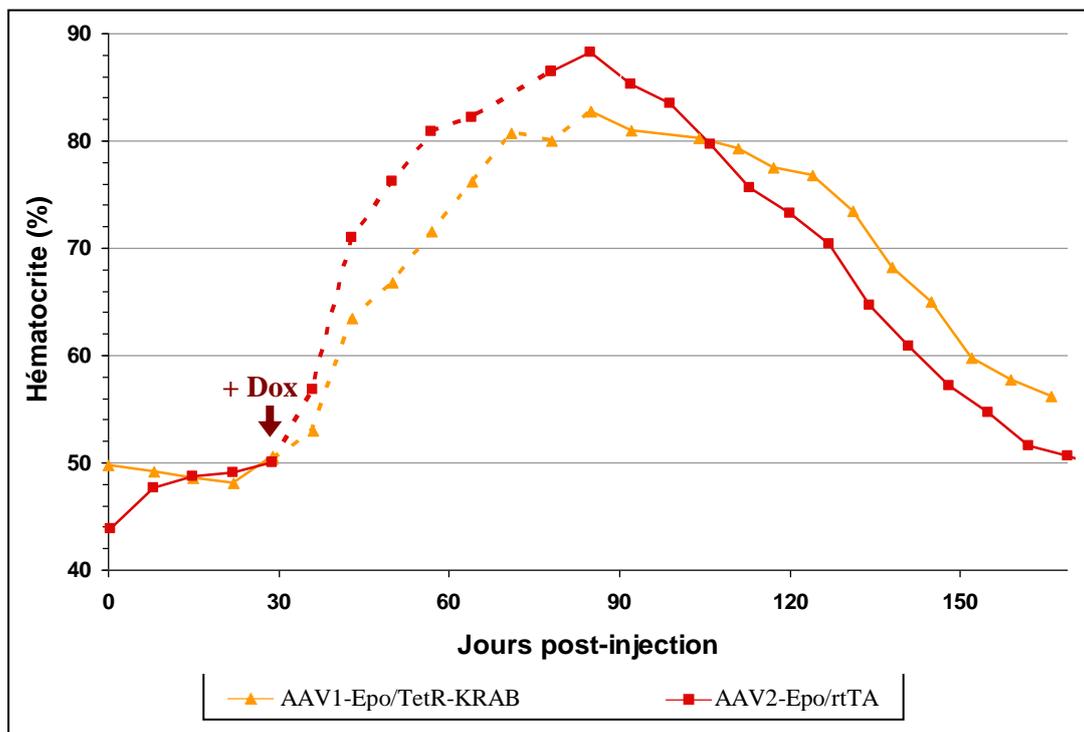


Figure 21 : Comparaison du système Tet-On et TetR-KRAB chez la souris

Les courbes représentent la moyenne de l'hématocrite des souris ayant reçu soit $1,3 \cdot 10^{10}$ vg d'AAVr-2-Epo/rtTA (Chenuaud *et al.*, données non publiées) (courbe rouge), soit $3 \cdot 10^9$ vg d'AAVr-1-Epo/TetR-KRAB (courbe jaune). Les souris étaient sous doxycycline dans leur eau de boisson (trait en pointillé) ou pas (trait plein). L'induction à la doxycycline a débuté 4 semaines post-injection et a duré 7 ou 8 semaines selon le groupe.

L'inductibilité suite à l'induction à la Dox est semblable avec les deux systèmes de régulation : dès 1 semaine après induction, une augmentation de l'Ht des souris injectées est observée, consécutive à l'expression du transgène Epo. Pour les deux systèmes de régulation, l'Ht se stabilise 7 semaines post-induction, et après arrêt de la Dox, le taux d'Ht redescend progressivement de manière équivalente.

Ainsi, nous avons montré que le système de régulation TetR-KRAB (associé au promoteur PGK) est aussi efficace que le système Tet-On chez la souris après transfert d'un gène rapporteur dans le muscle à l'aide d'AAVr :

- inductibilité forte en présence de doxycycline, modulable et réversible
- expression du transgène négligeable en absence d'inducteur
- persistance sur au moins 42 semaines de la régulation.

5. Perspectives

La suite de ce travail est d'évaluer chez le macaque ce système de régulation, afin de voir si, contrairement au transactivateur rtTA, le transrépresseur TetR-KRAB permet une régulation et expression à long terme du transgène Epo, sans activation du système immunitaire de l'hôte.

La construction PGK-FOR (figure 17A) ayant donné les meilleurs résultats chez la souris, elle a été choisie pour être évaluée chez le macaque. La séquence Epo de souris de cette construction a donc été remplacée par l'ADNc de l'Epo de macaque cynomolgus (cmEpo). Trois macaques ont reçu par voie IM le vecteur AAVr-1-cmEpo/TetR-KRAB. Deux mois post-injection, la première induction des macaques à la doxycycline par voie IV pendant 3 jours (10 mg/kg) a été réalisée. Le suivi de l'expression du transgène au cours des inductions successives à la Dox se fera par mesure régulière de l'Ht, taux de réticulocytes, et dosage d'Epo sérique, comme cela a été fait dans l'étude de Chenuaud *et al.* pour les macaques ayant reçu un vecteur AAV-Epo/rtTA en IM (Chenuaud *et al.*, 2004b). Cette étude est actuellement en cours, et nous attendons prochainement les résultats de la première induction à la Dox.

Dans le système Tet-On, le rtTA est composé d'une partie d'origine bactérienne (TetR) et d'une partie d'origine virale (VP16). Le VP16 a été remplacé par le domaine de répression KRAB afin d'obtenir le transrépresseur TetR-KRAB. Le domaine KRAB étant d'origine

humaine (gène humain Kox1), TetR-KRAB est, de par sa nature, théoriquement moins immunogène chez le macaque que le domaine VP16.

De plus, en orientation « forward » le promoteur CAG contrôlant l'expression du transrépresseur est à une distance inférieure à 3 kb de la séquence TetO. La répression du CAG, promoteur contrôlant l'expression du TetR-KRAB, est donc possible, ce qui pourrait aboutir à un équilibre : une fois fixé à TetO, le TetR-KRAB y reste lié tant qu'il n'y a pas de doxycycline. Ainsi, en absence d'inducteur, tout promoteur serait réprimé, et aucune synthèse d'Epo ou de TetR-KRAB n'aurait lieu. Ceci pourrait être un avantage dans la mesure où le transrépresseur ne serait pas produit continuellement dans la cellule transduite : le risque de provoquer une réponse immunitaire contre le TetR-KRAB serait alors diminué.

II. Relation entre voie d'administration, sérotype, biodistribution et système immunitaire après transfert de gène dans le muscle squelettique de primate à l'aide d'AAVr

Premier article

Safety and efficacy of regional intravenous (RI) versus intramuscular (IM) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle.

Alice Toromanoff, Yan Chérel, Mickaël Guilbaud, Magalie Penaud-Budloo, Richard Snyder, Mark Haskins, Jack-Yves Deschamps, Lydie Guigand, Guillaume Podevin, Valder Arruda, Katherine High, Hansell Stedman, Fabienne Rolling, Ignacio Anegon, Philippe Moullier, Caroline Le Guiner. 2008. *Molecular Therapy*, **16**(7):1291-1299.

L'injection intramusculaire de vecteurs AAV est une technique d'administration fréquemment utilisée dans les modèles précliniques pour faire sécréter par le tissu musculaire une protéine thérapeutique soluble (Arruda *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2001; Favre *et al.*, 2002; Flotte *et al.*, 2007; Herzog *et al.*, 2001; Kessler *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2005b). Ces différentes approches de thérapie génique ont été appliquées à l'homme dans plusieurs essais cliniques de phase I, pour traiter des patients atteints d'hémophilie B (Jiang *et al.*, 2006c; Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003), de déficits en alpha-antitrypsine (Brantly *et al.*, 2006) ou en lipoprotéine lipase (Nierman *et al.*, 2007).

Cependant, la voie IM est souvent associée à 2 inconvénients majeurs :

- l'activation du système immunitaire de l'hôte (Arruda *et al.*, 2004; Chenuaud *et al.*, 2004a; Favre *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004a; Herzog *et al.*, 2002; Le Guiner *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2006; Vandenberghe *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2007b; Yuasa *et al.*, 2007),
- l'impossibilité d'utiliser cette voie d'administration dans le but de traiter les maladies neuromusculaires qui nécessitent une transduction homogène et généralisée de tous les muscles affectés.

Nous avons donc mis au point dans le modèle macaque une administration par voie intraveineuse d'un vecteur AAVr dans un membre postérieur entier (RI pour *regional intravenous*), sans utilisation de drogue, pour tenter de transduire tous les muscles d'un membre de primate en une seule administration d'un vecteur AAV.

L'AAVr1 et l'AAVr8 sont deux des sérotypes qui transduisent le plus efficacement le muscle squelettique, c'est pourquoi nous avons restreint notre étude à la comparaison de l'efficacité de transduction et de la biodistribution de ces 2 sérotypes après transfert d'un gène rapporteur par voie IM ou RI.

Le gène rapporteur utilisé code la protéine soluble LEA29Y, un mutant de l'immunosuppresseur CTLA4-Ig (Larsen *et al.*, 2005). Son expression est facilement quantifiable par dosage ELISA dans le sérum des animaux.

Dans cette étude, nous avons comparé l'administration d'AAVr1 ou AAVr8 chez 8 macaque cynomolgus, administrés soit par voie IM soit par RI à la même dose de vecteur/kg. Nous nous sommes concentrés sur :

- les paramètres cliniques et biochimiques des animaux (toxicité de l'administration)
- la répartition de la transduction au niveau des tissus-cibles (muscles du membre postérieur)
- la présence du vecteur (particules infectieuses et génome) dans la circulation sanguine au cours de temps
- la biodistribution générale du génome AAVr dans tous les tissus au moment du sacrifice des animaux
- le profil d'expression du transgène au cours du temps
- les formes moléculaires du génome AAVr retrouvées dans le muscle à long terme.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article qui suit, publié en juillet 2008 dans le journal *Molecular Therapy*.

Safety and Efficacy of Regional Intravenous (RI) Versus Intramuscular (IM) Delivery of rAAV1 and rAAV8 to Nonhuman Primate Skeletal Muscle

Alice Toromanoff¹, Yan Chérel², Mickaël Guilbaud^{1,3}, Magalie Penaud-Budloo¹, Richard O Snyder^{1,4}, Mark E Haskins⁵, Jack-Yves Deschamps^{2,6}, Lydie Guigand², Guillaume Podevin⁷, Valder R Arruda⁸, Katherine A High^{8,9}, Hansell H Stedman¹⁰, Fabienne Rolling¹, Ignacio Anegón¹¹, Philippe Moullier^{1,3,4} and Caroline Le Guiner¹

¹INSERM UMR 649, CHU Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; ²INRA UMR 703, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France; ³EFS Pays de la Loire, Nantes, France; ⁴Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, Florida, USA; ⁵School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA; ⁶Service des Urgences, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France; ⁷Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France; ⁸The Children's Hospital of Philadelphia, Department of Pediatrics, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA; ⁹Howard Hughes Medical Institute, The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, USA; ¹⁰Department of Surgery, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA; ¹¹INSERM UMR 643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France

We developed a drug-free regional intravenous (RI) delivery protocol of recombinant adeno-associated virus (rAAV) 1 and 8 to an entire limb in the nonhuman primate (NHP), and compared the results with those produced by intramuscular (IM) delivery of the same dose of vector. We show that RI delivery of both serotypes was remarkably well tolerated with no adverse side-effects. After IM, muscle transduction was restricted to the site of injection with a high number of vector copies per cell for rAAV1. In contrast, although RI delivery resulted in a lower vector copy per cell, it was detectable in the vast majority of muscles of the injected limb. The amounts of circulating infectious rAAV were similar for both serotypes and modes of delivery. At autopsy at up to 34 months after vector administration, similar biodistribution patterns were found for both vectors and for both modes of delivery, with numerous organs found to be positive for vector sequence when assayed using PCR and Southern blot. Altogether, we demonstrated that RI is a simple and efficient transduction protocol in NHPs, resulting in higher expression of the transgene with a lower number of vector genomes per cell. However, regardless of the mode of delivery, concerns continue to be raised by the presence of vector sequences detected at distant sites.

Received 31 January 2008; accepted 2 April 2008; published online 6 May 2008. doi:10.1038/mt.2008.87

INTRODUCTION

Intramuscular (IM) injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors was investigated in preclinical models as a potential means to deliver secreted gene products to the serum.^{1–12} Clinical translation of this approach was reported in the cases of

hemophilia B,^{13–15} α -antitrypsin-deficient,¹⁶ and lipoprotein lipase-deficient patients.¹⁷

However, two major drawbacks associated with IM rAAV delivery are: (i) the high risk of immune responses because of the large amounts of vector and/or high levels of transgene expression in a restricted area,^{3,9,12,18–25} (ii) the need for widespread transduction of most muscles when addressing the treatment of muscular dystrophies.

Early studies of gene transfer to total striated muscle were initiated almost two decades ago. Instead of multiple IM injections, invasive high-pressure arterial infusion protocols were developed and used in dogs¹ and nonhuman primates (NHPs)²⁶ to achieve expression of foreign genes throughout the muscles of the hindlimb. These approaches also often included vascular permeability factors such as histamine or papaverine to achieve acute permeabilization of the peripheral microvasculature so as to enhance tissue transduction. Since then, significant improvements have been made, including a tourniquet placed at the level of the proximal thigh followed by a high-pressure infusion through a peripheral distal vein in the absence of vascular pharmaceutical agents.²⁷ Using this simple and drug-free afferent transvenular retrograde extravasation (also called “regional intravenous” or RI) procedure in rats and dogs, delivery of 10¹⁴ vector genome (vg)/kg of rAAV1 led to uniform gene transfer to muscle fibers of the entire limb with no clinical evidence of postprocedural peripheral valvular incompetence.²⁷

Another aspect of rAAV-mediated muscle transduction is that certain rAAV serotypes emerged as superior at transducing skeletal muscle after either systemic or IM delivery. In mice, rAAV1, rAAV6, and (more recently) rAAV7 and rAAV8, were shown to be far more efficient in this respect than rAAV2.^{28,18,28–30} In hemophilic dogs, higher levels of transgene expression were achieved with rAAV1 than with rAAV2.¹⁸ IM delivery of rAAV1 was also

Correspondence: Caroline Le Guiner, INSERM UMR 649, Bâtiment Jean Monnet, CHU Hôtel-Dieu, 30 Boulevard Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail: caroline.le-guiner@univ-nantes.fr

successful in the lipoprotein lipase-deficient cat model.⁹ Finally, in NHPs, rAAV1 had an enhanced ability for skeletal muscle transduction.^{7,31} However, side-by-side comparative studies and evaluation of rAAV8 in skeletal muscles of large animal models are essentially lacking.

At this point of time, when: (i) rAAV vectors in clinical trials targeting the skeletal muscle are exclusively administered IM for which, however, dose-dependent immune toxicity data were established experimentally in preclinical models; (ii) the recent development of a simple and drug-free RI rAAV delivery method to muscle in dogs has been described; and (iii) alternative rAAV serotypes with higher muscle tropism are available, a better understanding of the factors that can influence safety and optimize skeletal muscle transduction is still warranted.

In this study, the safety profiles of rAAV1 versus rAAV8 vectors were established from a cohort of eight NHPs. Vectors were administered either by IM or RI at an identical vector genome per kilogram dosage. Immediate and long-term monitoring (up to 34 months) of the animals included: (i) clinical and biochemical parameters; (ii) *in situ* transduction patterns; (iii) leakage in the circulation; (iv) complete biodistribution spectrum of the rAAV genome in all organs at the time of killing the animal; (v) transgene expression profiles; and (vi) molecular status of the rAAV genome in the muscle.

RESULTS

Clinical and biological tolerance of the injection protocols

Our first four NHPs (Mac 1 through Mac 4) received rAAV1 while the next four NHPs (Mac 5 through Mac 8) received rAAV8 vector. Within each group, the first two animals had the rAAV vector administered by IM (Mac 1, Mac 2 and Mac 5, Mac 6), whereas the last two received it by RI (Mac 3, Mac 4 and Mac 7, Mac 8). The vector encoded for a functional mutated form of the immunosuppressor CTLA4Ig, known as LEA29Y.³²

Neither of the rAAV serotypes and neither mode of delivery exhibited detectable immediate or delayed adverse outcomes. RI, which lasted 30–40 minutes from the installation of the tourniquet to the removal of the venous catheter, was consistently well tolerated. Clinical laboratory parameters including creatine kinase, electrolytes, kidney and liver function tests, and complete blood count remained normal in the hours, days, and weeks after injection (data not shown). The innate immune system was also monitored from 30 minutes until 1 week after injection by measuring the inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in the sera of all eight animals. We found no significant elevation in any of them (data not shown).

Muscle transduction pattern after IM versus RI administration of rAAV

In order to establish a short-term transduction assessment, muscle biopsies were obtained 5 weeks after the injection. In the IM group, one biopsy was carried out at one of the pretattooed sites of rAAV injection and another one ~1 cm away. In the RI group, biopsies were obtained from two muscles in the transduced leg (gastrocnemius and tibialis anterior) and two others in the homolateral thigh (biceps femoris and sartorius). Vector copy

Table 1 Vector genome copy numbers per diploid genome in injected muscle biopsies obtained after surgical biopsies 5 weeks after rAAV delivery

	rAAV1		rAAV8		
	IM group				
	Mac 1	Mac 2	Mac 5	Mac 6	
Injection site	189	50	3.6	6.5	
≈1 cm away	24	7	2.9	3.6	
	RI group				
	Mac 3	Mac 4	Mac 7	Mac 8	
	Gastrocnemius	15	28.9	1	4.4
	Tibialis anterior	1.6	0.9	0.5	0.9
	Biceps femoris	13.7	1.4	0.7	3.4
Sartorius	1.1	0.1	0.04	0.1	

Abbreviation: Mac, macaque.

In the intramuscular (IM) group, one biopsy was done precisely at one of the injection site (pretattooed) and another biopsy ≈1 cm away. In the regional intravenous (RI) group, biopsies were obtained from two muscles in the infused leg (gastrocnemius and tibialis anterior) and two others in the homolateral thigh (biceps femoris, and sartorius). Vector copy numbers per diploid genome were determined by quantitative PCR.



Figure 1 CTLA4 staining of rAAV-LEA29Y-injected muscles 5 weeks after rAAV delivery. Samples obtained from muscle biopsies. Scale bar = 250 μ m. (a) Mock-injected muscle. (b) rAAV1-IM-injected muscle. Cryosection obtained at the injection site (tibialis anterior from Mac 1). (c) rAAV1-RI-injected muscle (gastrocnemius from Mac 3). IM, intramuscular; Mac, macaque; rAAV, recombinant adeno-associated virus. RI, regional intravenous.

numbers were determined by quantitative PCR using the LEA29Y sequence present in the rAAV genome. The endogenous ϵ -globin gene served as the internal reference and the sensitivity was 0.01 LEA29Y copy/diploid genome. As shown in **Table 1**, IM injection of rAAV1 resulted in a steep gradient with vector copy numbers being high at the site of the injection and 7 to 8 times lower ~1 cm away. In contrast, rAAV8 administered by IM resulted in reduced vector copy numbers at the injection site but these numbers were maintained within a radius of ~1 cm. This suggests that rAAV8 has the ability to diffuse more effectively than rAAV1 within the skeletal muscle after IM delivery. The RI delivery route resulted in a diffuse transduction pattern in all the muscles of the injected limb, with ~5 to 6 times more vg/diploid of genome seen with the use of rAAV1 than with rAAV8.

We correlated the quantitative PCR findings with immunohistochemical analysis using an anti-CTLA4 antibody. We showed the presence of LEA29Y-positive myofibers arranged in clusters only at the IM injection site of the rAAV1 vector (**Figure 1b**), whereas RI delivery of the same serotype showed more evenly distributed staining (**Figure 1c**). The average vector copy numbers were too low in the rAAV8 groups to allow the immunohistochemical detection of LEA29Y-positive fibers. Altogether, both assays were consistent and indicated that, at

Table 2 Muscle transduction pattern at euthanasia

	rAAV1				rAAV8			
	IM		RI		IM		RI	
	Mac 1	Mac 2	Mac 3	Mac 4	Mac 5	Mac 6	Mac 7	Mac 8
Pelvis								
Rectus abdominis	nd							
Coccygeal	nd	nd	nd	0.06	nd	nd	0.1	nd
Gluteus medius	nd							
Gluteus maximus	nd	nd	0.08	0.1	nd	nd	nd	nd
Thigh								
Tensor of fascia lata	nd	nd	0.01	nd	nd	nd	nd	nd
Rectus femoris	nd	nd	0.6	0.03	nd	nd	nd	nd
Vastus lateralis	nd	nd	6.7	0.01	nd	nd	0.02	0.1
Vastus intermedius	nd	nd	5.9	0.05	nd	nd	0.1	0.8
Biceps femoris	nd	nd	8.2	0.4	nd	nd	0.3	nd
Semitendinosus	nd	nd	3.5	9.5	nd	nd	0.2	0.07
Semimembranosus	nd	nd	1.8	3	nd	nd	0.3	0.06
Sartorius	nd	nd	1.5	6.7	0.08	nd	0.4	0.7
Gracilis	nd	nd	20.6	6.3	nd	nd	0.5	0.3
Adductor magnus	nd	nd	0.03	0.8	nd	nd	0.02	0.02
Leg								
Tibialis anterior	31.4	36.1	0.1	0.3	7.2	9.4	0.1	0.05
Abductor digitorum longus	nd	nd	1.3	6.5	1	nd	0.2	0.4
Peroneus longus	12.8	NA	0.2	6.2	NA	1.5	0.05	0.3
Gastrocnemius lateralis	nd	nd	10.8	7	nd	nd	1.1	0.3
Gastrocnemius medialis	nd	nd	17.1	17.1	nd	nd	1.3	0.6
Soleus	nd	nd	7.2	3.7	nd	nd	1	0.3
Flexor digitorum lateralis	nd	nd	0.3	3.1	nd	nd	1.5	0.5
Flexor digitorum medialis	nd	nd	0.8	4.7	nd	nd	0.7	0.3
Flexor digitorum brevis	nd	nd	nd	2.5	nd	0.01	0.03	0.09
Quadratus plantae	nd	nd	nd	0.9	nd	nd	nd	0.1
Noninjected limb								
Biceps femoris	nd	nd	nd	0.01	nd	nd	0.06	nd
Sartorius	nd	nd	0.06	0.02	nd	nd	nd	nd
Tibialis anterior	nd							
Gastrocnemius lateralis	nd							

Abbreviations: IM, intramuscular; Mac, macaque; NA, not available; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RI, regional intravenous.

Vector genome copy numbers per diploid genome were determined by quantitative PCR and are represented by a color code: white indicates not detected (nd) or values <0.01 copy per diploid genome; light gray indicates values >0.01 and <5 copies/diploid genome; dark gray indicates values >5 vector genome copies/diploid genome.

5 weeks after the direct IM administration of rAAV1, the particles associated with high local vector genome copy numbers showed little diffusion into the muscle.

Between 14 and 34 months after the injection, the animals were killed and each muscle of the injected limb was carefully dissected. The quantitative PCR analysis described earlier was performed on total DNA extracted from a biopsy taken from the middle of each muscle. IM delivery of rAAV1 and rAAV8 resulted in transduction that was essentially confined to the injected muscle. In contrast, after RI delivery vector genome was detected throughout the muscle groups supplied by the injected

vessel, with significantly more vector genomes in the entire limb when injected with rAAV1 than with rAAV8 (4.1 ± 5.1 and 0.3 ± 0.4 vg/diploid genome, respectively; $P < 0.05$, analysis of variance) (Table 2, Figure 2).

Vector biodistribution

Because vector doses were identical among all the groups, a comparative analysis of rAAV spreading was possible, both in the sera and in several distant organs.

In the sera, obtained immediately after the injection and in the following days, the circulating infectious rAAV particles were

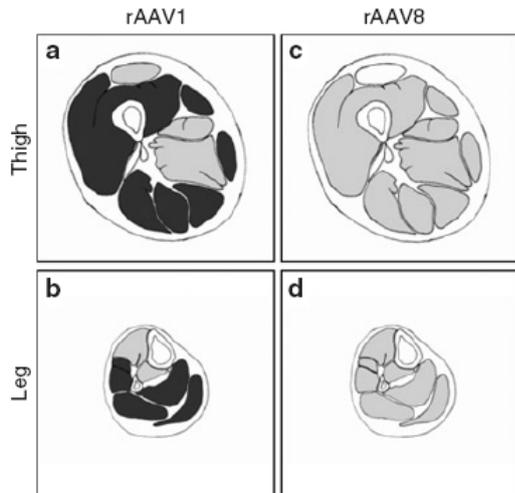


Figure 2 Spatial representation of the presence of the vector genome in the muscles of the infected limbs. **(a,c)** Representation at mid-thigh and **(b,d)** mid-leg for **(a,b)** rAAV1- and **(c,d)** rAAV8-infused limbs. Color code: (i) white muscles, <0.01 vector genome (vg)/diploid genome; (ii) light gray muscles, 0.01–5vg/diploid genome; (iii) dark gray muscles, >5 vg/diploid genome. rAAV, recombinant adeno-associated virus.

monitored using a replication centre assay,³³ with a sensitivity of 5×10^2 infectious particles/ml of serum (ip/ml). For both serotypes, the number of infectious particles/milliliter was maximal at 30 minutes when delivered by the RI route and at 6 hours when delivered IM (data not shown). Interestingly, at the maximal number of infectious particles per milliliter and assuming that the total serum volume of a macaque is 4% of its weight, the percentages of infectious virions found in the serum with reference to the total dose injected were not significantly different ($P > 0.05$, analysis of variance) between the IM and RI groups ($5.2 \pm 3.2\%$ and $11.4 \pm 4.6\%$, respectively). The replication centre assay became negative for all the animals within 7 days after the injection irrespective of the rAAV serotype and the mode of delivery used (data not shown).

Using PCR, we also investigated the presence of rAAV in the serum, after DNase treatment, looking for the physical presence of particles. The sensitivity of the test was 350vg/ml of serum. Serum samples from day 2 to 3 months after the injection were found to be positive for several weeks for the rAAV1 vector, whereas the rAAV genome was no longer detectable at 1 week after the injection of rAAV8 (**Table 3**).

In order to enhance the sensitivity of vector genome detection in solid tissues, PCR amplicons were further processed using Southern blot. With this combined approach, a threshold of 0.1 vector genomes could be detected in 75 ng of total DNA ($\sim 3 \times 10^{-5}$ copy/diploid genome). It was applied to total DNA extracted from biopsy samples (liver, draining and distant lymph nodes, and one of the two gonads) taken between 5 and 26 months after the injection. All samples except the one gonad from Mac 8 were positive for vector sequence (**Table 4**). Further, at the time-points at which the animals were killed (14–34 months after the injection), vector sequence was found in all samples of liver, draining and distant lymph nodes, spleen, and kidney, regardless of the serotype and the mode of delivery. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were all positive for vector sequences within the first 3 months after injection.

Table 3 Detection of rAAV vector sequences by PCR in serum

	Before injection	Time after injection of rAAV-LEA29Y						
		2 days	4 days	7 days	14 days	1 month	2 months	3 months
rAAV1								
IM								
Mac 1	–	+	+	+	+	+	–	–
Mac 2	–	+	+	+	+	–	–	–
RI								
Mac 3	–	+	+	+	+	+	+	–
Mac 4	–	+	+	+	+	–	–	–
rAAV8								
IM								
Mac 5	–	+	+	+	–	–	–	–
Mac 6	–	+	+	–	–	–	–	–
RI								
Mac 7	–	+	+	–	–	–	–	–
Mac 8	–	+	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: IM, intramuscular; Mac, macaque; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RI, regional intravenous.

Sera obtained from each individual at the indicated time points were DNase treated, and encapsidated vector DNA was extracted. Detection on agarose gel of the vector genome after PCR is indicated as (+), lack of signal as (–).

Surprisingly, at the time-points at which the animals were killed, PBMCs from the rAAV1 group were still positive for the vector, whereas PBMC from 3 of the 4 animals injected with rAAV8 were negative (**Table 4**).

Figure 3 is a representative example of an animal (Mac 1) in which vector sequence was detected in major organs 34 months after the injection of rAAV1. A striking finding was the persistence of the transgene in all the lymphoid territories investigated.

Finally, a comprehensive PCR/Southern blot analysis was performed on all the organs collected from each of the animals at the time they were killed (**Supplementary Table S1**). All the animals, including Mac 5, Mac 7, and Mac 8 which had PBMCs negative for vector genome for several months before they were killed (**Table 4**), exhibited transduction in a variety of organs.

Transgene expression pattern

Even though Mac 1 to 4 received identical doses of rAAV1, the average serum levels of LEA29Y were ≈ 5 –8 times higher after RI delivery than after IM delivery (**Figure 4a**). In contrast, both IM and RI administration of rAAV8 and RI delivery of rAAV1 resulted in identical levels of LEA29Y serum levels (**Figure 4b**). However, Mac 5 developed a transient humoral response against the transgene product, characterized by the generation of anti-LEA29Y antibodies (data not shown).

In order to investigate whether, after IM delivery, the transduced muscles were solely responsible for LEA29Y secretion, both the tibialis anterior and the peroneus longus from Mac 1, 2, 5, and 6 were surgically removed and the transgene expression was monitored. Interestingly, although transgene secretion dropped after the expected half-life of ≈ 2 weeks, (<http://bms.com/products/data/index.html>, Orenca; Bristol-Meyers Squibb, Princeton, NJ), LEA29Y persisted even thereafter at about

Table 4 Detection of rAAV vector sequences by PCR and Southern blot in major organs

	Tissues										
	Biopsies				Euthanasia						
	Liver	Draining LN	Distant LN	Gonad	Liver	Draining LN	Distant LN	Gonad	Kidney	Spleen	PBMC (a/b)
rAAV1											
IM											
Mac 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	34/34
Mac 2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	34/34
RI											
Mac 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	27/27
Mac 4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	14/14
rAAV8											
IM											
Mac 5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	15/19
Mac 6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	20/20
RI											
Mac 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3/20
Mac 8	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	13/19

Abbreviations: IM, intramuscular; LN, lymph node; Mac, macaque; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RI, regional intravenous.

Total DNA was extracted and PCR/Southern blot analysis were carried out as described in Material and Methods. Biopsies were carried out 5–26 months after the rAAV injection (p.i.) for liver, 3 months after the injection for LN, 2–10 months p.i. for gonads. Positive (+) and negative (-) signals with appropriate controls. (a/b), (a) latest month p.i. when PBMC were found positive for vector genome; (b), euthanasia (months p.i.).

one-third to one-half of the presurgery levels, indicating the presence of additional ectopic sites of transgene secretion (Figure 4a and b, inserts). Because of the presence of low titers of anti-LEA29Y antibodies, Mac 5 showed a dramatic decline in LEA29Y levels immediately after the surgery. Yet, at the time-point when the animal was killed, the antibodies were still detectable (data not shown), but serum LEA29Y levels were stable at a value similar to that in Mac 6 (Figure 4b, insert).

In order to document the presence of ectopic secretion sites of LEA29Y, reverse transcriptase-PCR analyses were performed. At the time-points when the animals were killed, the PBMCs and spleen had no detectable LEA29Y transcripts, but all the livers and most of the draining lymph nodes displayed an amplification product, whereas none was detected in the absence of reverse transcriptase (data not shown).

In situ vector structure

Finally, we asked the question whether the mode of delivery, IM versus RI, would result in different rAAV molecular structures. The rAAV sequences were analyzed using Southern blotting after electrophoresis of total DNA from IM- and RI-injected muscles 21–27 months after the injections. Using the Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element and polyA sequences to probe the rAAV molecules, we found, in both IM and RI groups, an identical pattern irrespective of the serotype (Supplementary Figure S1 and Supplementary Materials and Methods). When total DNA was digested by *Xba*I, an enzyme that does not cut within the rAAV genome, the status of the input vector DNA was more easily detectable. For both IM and RI delivery, no single-stranded rAAV genome was observed, but a signal corresponding to the expected size for the double-stranded monomer was

present, as well as high-molecular-weight forms. Using *Eco*RI, a single-cutter enzyme, vector genomes were resolved either as head-to-head or head-to-tail repeats.

DISCUSSION

In this study, using NHPs, we carried out side-by-side testing of RI versus IM delivery of rAAV1 and rAAV8 vectors, which are among the most efficient serotypes for transduction of skeletal muscle. At a time when studies have raised concerns about the potential for rAAV-mediated insertional mutagenesis in mouse liver,^{34,35} and the host immune response against the transgene^{19,20} or the AAV capsid^{36–38} in large animals, determining the presence of the transgene within and outside the target tissue was thought to be pertinent.

Consistent with the results of a study involving RI administration of rAAV2 in dogs,²⁷ our first observation was that the RI delivery procedure in primates was particularly well-tolerated, with no detectable side-effects during and after the procedure. Quantification of the recombinant genome indicated that, at 5 weeks after RI administration and at the time of killing (14–20 months after the injection), both rAAV1 and rAAV8 had transduced the vast majority of the muscles in the entire limb. It is difficult to compare these results with those of earlier studies involving RI administration in large animal models, because none of those studies had quantified the number of vector copies in the perfused limb.^{1,27} However, even though the dose we administered was 20 times less than the one used in the Su *et al.* study,²⁷ we were able to detect significant amounts of vector genomes in most muscles of the leg and thigh.

Our data also indicate that rAAV1 diffuses poorly after IM injection, as shown by the fact that the transduction gradient

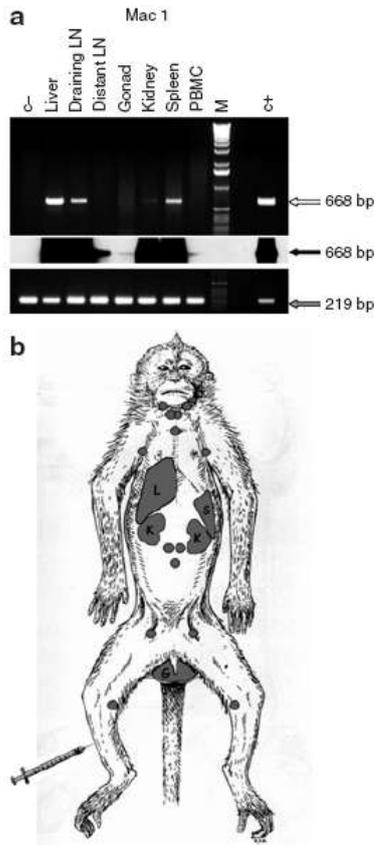


Figure 3 PCR detection of rAAV-LEA29Y vector in major organs. Total DNA was extracted from each tissue at the time of killing the animals. **(a)** Representative example obtained from Mac 1 injected intramuscularly (IM) with recombinant adeno-associated virus-1 (rAAV1) in its right tibialis anterior muscle. The 668–base pair (bp) fragment corresponds to the vector amplicons detected 34 months after rAAV delivery: PCR products were separated on an agarose gel (open arrow), then transferred to a nylon membrane and hybridized to a LEA29Y probe (solid arrow). Each sample was also subjected to amplification of a 219-bp glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase DNA fragment (gray arrow). Also shown are the DNA marker (M), a positive control from the vector plasmid (C+), and a negative control obtained from peripheral blood mononuclear cell (PBMC) DNA before rAAV injection (C–). **(b)** Schematic drawing of the detection of vector sequence in selected organs (gray color) 34 months after IM delivery of rAAV1. L, liver, G, gonads, K, kidneys, S, spleen, and grey circles, lymph nodes. Mac, macaque.

expressed as vg/diploid genome between the site of injection and the surrounding area was seven- to eightfold whereas this gradient was absent for rAAV8. A similar finding was made with rAAV2 vector encoding for factor IX after IM administration in normal dogs.¹ Eight weeks after the injection, factor IX expression was found confined to the sites of injection, with a radius of diffusion of ≈ 0.5 mm. This shows that rAAV1 and rAAV2 seem to be unable to cross the physical and biological barriers that limit gene vector dissemination within the skeletal muscle. In contrast, it was recently shown that after intravenous or IM delivery in adult mice and hamsters, rAAV8 could cross the capillary blood vessel barriers in the skeletal muscle more efficiently than rAAV1.^{30,39} This may partly explain the dramatic difference in the LEA29Y secretion pattern found in our IM cohorts, with identical vector doses resulting in a ≈ 5 – 8 times higher secretion of LEA29Y with rAAV8 than with rAAV1.

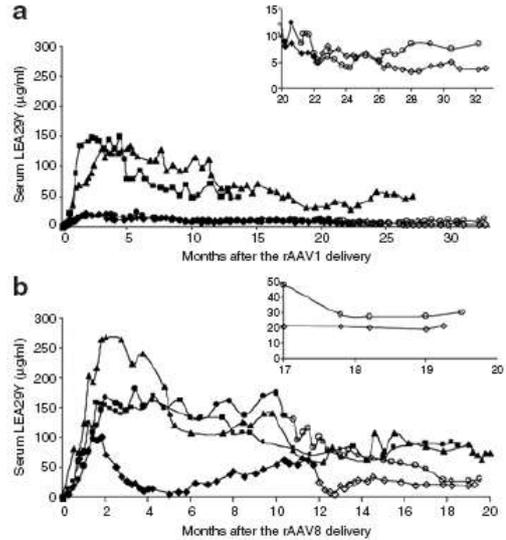


Figure 4 Kinetic of circulating levels of LEA29Y after rAAV-mediated gene transfer in the eight macaques. **(a)** rAAV1-injected animals (closed diamonds, Mac 1, closed circles, Mac 2, closed triangles, Mac 3, closed squares Mac 4) and **(b)** rAAV8-injected animals (closed diamonds, Mac 5, closed circles, Mac 6, closed triangles, Mac 7, closed squares, Mac 8) injected animals. Open symbols represent serum LEA29Y levels after the entire injected muscle was surgically removed in all intramuscularly (IM)-injected animal. Inserts represent zooms of the LEA29Y secretion profiles obtained in the animals of the IM group after remove of the injected muscles. Mac, macaque.

However, even though the secretion levels of LEA29Y after IM and RI delivery of rAAV8 were higher than or similar to those obtained with the use of rAAV1, the numbers of vector copies detected in rAAV8-transduced muscles were significantly lower than when rAAV1 was used. These data suggest that there could be differences in some early steps of the transduction processes of rAAV1 and rAAV8, as has been shown when comparing the action of rAAV2 versus rAAV8 in mouse liver.⁴⁰ Although we showed that the extrachromosomal molecular status of both vectors was identical several months after the injection, the release of single-stranded rAAV1 genomes within the nucleus at early time-points may be less efficient than with rAAV8. This is a possible explanation for the fact that rAAV8 is finally biologically more active than rAAV1.

rAAV1 and rAAV2 on the one hand and rAAV8 on the other could be viewed as extreme serotypes in terms of intramuscular diffusion ability, leading to high versus low concentrations of transgene product at the IM injection site. This, in turn, may activate cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses and/or antibody formation against the transgene and/or the capsid.^{4,19–23,41,42} High local transgene product may also promote misfolding and/or aberrant post-translation modifications,^{43,44} which may favor host immune recognition.

Our data also indicate that both rAAV1 and rAAV8, as well as IM and RI protocols, led to delayed but similar levels of infectious particle leakages from the target organ within hours after the injection. This may favor the transduction of other organs, including the lymphoid organs, which are critically involved in antigen presentation and in initiation of the immune response. In fact, using a sensitive detection assay, vector genomes were found in

the vast majority of the tissues regardless of the serotype and the route of administration. Regarding the PBMCs, although vector genomes were easily detectable by PCR in the first few days after injection in all the macaques, the amplicons had to be further processed by Southern blot in order to be detectable for several months and up to the killing of the animals 34 months after the injection. The genome was transcriptionally active in the liver and in the draining lymph nodes, a finding that may provide an explanation for the persistent presence of LEA29Y in the serum after the transduced muscles were surgically removed.

The finding that vector genome was cleared from the sera was surprising, because rAAV1 vector remained detectable by PCR for 1–2 months after the injection (Mac 1, Mac 3). However, these results were consistent with similar findings obtained from blood samples of mice and rabbits that were given, through the IM route, rAAV1 encoding for the α -1-antitrypsin cDNA.⁴ In that study, it was unclear whether the recombinant genome was detected in the serum, in the PBMCs or in both. In contrast, rAAV8 could be cleared from the serum within a week. What we detected in sera could not have been a contamination of vector genome originating from transduced PBMC DNA, because a housekeeping gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) could not be amplified (data not shown). Therefore rAAV1 remains detectable as DNase-resistant particles for an unusually long period of time after the injection. Although this could be an intrinsic feature of this serotype, in certain tissues such as the skeletal muscle, virions may be trapped as intact particles in “protective” locations such as the transverse (T) tubules, which are unique to skeletal and cardiac muscle. rAAV vectors would then be slowly released over time into the systemic compartment, a hypothesis that had already been proposed for rAAV2 particles.⁴⁵ This explanation supports the common observation that rAAV vectors elicit delayed and robust immune infiltrates after IM delivery regardless of the transgene expressed, the promoter, the viral purification methods, or the injection of empty versus full rAAV particles.^{3,4,12,46,47} Such a slow-release mechanism from remote “protective” sites could also help to explain why it has not been possible to model the elimination of *in vivo* transduced target cells by a capsid-specific CTL response.^{23,48–50}

In summary, we showed, in NHPs, that IM delivery of a clinically relevant dose of either rAAV1 or rAAV8 was followed by significant leakage, which, in turn, resulted in widespread transduction of most of the organs. Among them, all the lymphoid organs tested and all the livers were transduced, which raises concerns in the light of the recently described rAAV-related liver genotoxicity in mice³⁴ and immunotoxicity in hemophilia B patients.³⁶ Further, we demonstrated the existence of an efficient limiting factor during rAAV1 transduction when delivered by IM in NHP muscle. The lack of IM diffusion of rAAV1 as opposed to rAAV8 from the IM site is a possible explanation. Finally, regardless of the serotype used, RI delivery was well tolerated and remarkably efficient, with transduction events being reproducibly detected in the 20 hindlimb muscles.

MATERIALS AND METHODS

Vector production. The vector plasmid was generated by cloning the LEA29Y sequence in the pZA backbone (kindly provided by J.M. Wilson, Philadelphia, PA) between the rous sarcoma virus (RSV) promoter and

the Woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element. The LEA29Y sequence was obtained by oligonucleotide-directed mutagenesis leading to the substitution of two amino acids, *i.e.*, L104E and A29Y,³² in the CTLA4-Ig sequence (kindly provided by B. Vanhove, INSERM UMR 643–Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France). Recombinant AAVs were manufactured as described elsewhere³¹ and purified by cesium chloride density gradients followed by extensive dialysis against phosphate-buffered saline (PBS). Given that the aim of our study was to compare two different rAAV serotypes and two different modes of delivery, all the animals had to receive the same dose of vector. For this, each vector stock was titered repeatedly using dot blot and quantitative PCR by different individuals, in our laboratory as well as in Genethon (Evry, France).

Animals. Experiments were conducted on 3–5 kg male captive-bred cynomolgus macaques purchased from BioPrim (Baziège, France). The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes (France) approved the protocol. We selected primates that had no detectable neutralizing antibody against AAV serotypes 1 and 8 in the serum. All blood samples were collected under ketamine-induced anesthesia (10 mg/kg). Surgical biopsies (muscle, lymph nodes, liver, and gonad) were performed under ketamine (8 mg/kg)/medetomidine (20 μ g/kg)-induced anesthesia, and marbofloxacin and meloxicam were administered for the following 3–5 days so as to avoid discomfort for the animal. The animals were killed at different time-points after the injection (Footnote b in Table 4) and tissues were collected (Supplementary Table S1).

Vector administration. Eight macaques were distributed between two groups. The first four animals (Mac 1 through Mac 4) received the rAAV1 serotype whereas the next four (Mac 5 through Mac 8) received the rAAV8 vector serotype. Within each of the two serotype groups, the first two animals had the rAAV vector administered by IM (Mac 1 and Mac 2; Mac 5 and Mac 6), whereas the last two received the vector by RI (Mac 3 and Mac 4; Mac 7 and Mac 8). In order to prevent an eventual immune response against the human LEA29Y, each macaque was immunosuppressed with 40 mg/kg/j of mycophenolate mofetil and 5 mg/j of prednisone, both orally administered, during the first 3 weeks after rAAV administration.

IM delivery: Anesthesia was induced with medetomidine in combination with ketamine and maintained with isoflurane. The total vector dose was 5×10^{12} vg/kg split over three pretattooed injection sites along the tibialis anterior muscle in a total volume, per injection site, of 170–300 μ l depending on the weight of the animal.

RI delivery: The procedure for RI delivery has been published elsewhere, and this was adapted to the NHP model with no modification.²⁷ Briefly, anesthetized macaques underwent cannulation of the small saphenous vein with a 22-gauge catheter. A tourniquet was placed transmuscally at the level of the coxo-femoral articulation. Standard intravenous tubing and pressure bag were used for administering rAAV-LEA29Y (5×10^{12} vg/kg) diluted in 50 ml/kg of sterile Ringer-lactate solution, at a delivery pressure of 350 mmHg for 5 minutes. Once the vector was infused, the limb appeared dramatically swollen. Transvenular extravasation of the vector was allowed for 15 minutes, after which the tourniquet was released and the venous cannula removed.

DNA analysis

Extraction of rAAV DNA from serum: Using the Qiamp Viral RNA minikit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France), rAAV DNA was extracted from 140 μ l of serum that had been incubated with 30 U of DNase I (Roche Applied Science, Meylan, France) for 1 hour at 37°C. One tenth of the extraction (8 μ l) was then analyzed using PCR.

Extraction of genomic DNA from PBMCs and other tissues: Mononuclear cells were isolated by density-gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Courtaboeuf, France). Total DNA was extracted

from PBMCs using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Total DNA from other tissues was extracted as described earlier.³

PCR analyses: PCR analyses were performed using 75 and 750 ng of DNA. The 5' primer (5'-GGAGGCACTGGGCAGGTAA) was located in the chimeric intron after the rous sarcoma virus promoter, and the 3'-primer (5'-GTCCAGGCAGGATCGACCT) encompassing the extra cellular domain of CTLA4 and the Fc fragment of IgG1 DNA sequences. We used GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, California). The PCR cycle was: initial denaturation at 94°C for 5 minutes followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 68°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 10 minutes. Amplified products were analyzed using agarose gel electrophoresis followed by transfer under alkaline conditions to Hybond N+ membrane (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK). The membrane was hybridized to a 651-base pair LEA29Y fluorescein-labeled probe (Gene Images Random Prime Labeling Module; GE Healthcare Life Science). A control reaction was performed to detect the cynomolgus glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase sequence (5'-CGGATTTGGTTCGTATTGGG-3'/5'-GGGATCTCGCTCCTGGAAG-3'). The PCR cycle was: initial denaturation at 94°C for 5 minutes followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 10 minutes.

Quantitative PCR analysis: Quantitative PCR were conducted on a LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Meylan, France) using 10 and 30 ng of genomic DNA in duplicates. All reactions were performed in a 20 µl final volume containing 5 µl of template DNA, 10 µl of Premix Ex Taq (TaKaRa, Shiga, Japan), 0.4 µl of ROX Reference Dye (TaKaRa, Shiga, Japan), 0.2 µmol/l of each primer, and 0.1 µmol/l of probe. Transgene copy numbers were determined using primers designed to specifically amplify the transgene sequence, and genomic DNA copy numbers were determined using primers designed to amplify the macaque ε-globin gene. For each sample, C_t values were compared with those obtained with plasmid (containing either the LEA29Y sequence or the macaque ε-globin sequence) standard dilutions. The thermal profile was (identical for all reactions): 5 minutes at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minutes. The primers for the transgene sequence were: forward 5'-AAGGTTACAAGACAGGTTAAGG-3', reverse 5'-ATGCTTGGAACAGGAGTGC-3'; the probe in this system was 5'-CATCCACTTTGCCTTCTCTCCA-3'. The primers for ε-globin were: forward 5'-TGGCAAGGAGTTCACCCCT-3', reverse 5'-AATGGCGACAGCAGACACC-3'; the probe was 5'-FAM-TGCAGGCTGCCTGGCAGAAGC-3'-TAMRA.

Immunohistochemical analysis. The detection of LEA29Y was carried out in accordance with classical immunohistochemical procedures. Six-micrometer-thick cryostat sections from muscle samples were collected on poly-L-lysine-coated slides, fixed in acetone, and incubated. The sections were then pretreated with PBS containing 2% of normal goat serum (Dako, Trappes, France) so as to block nonspecific binding sites. Incubation was carried out for 1 hour at 37°C in a moist chamber with a polyclonal antibody directed against human CTLA4 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluted 1/200 in PBS containing 2% bovine serum albumin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). After three washes in PBS, the sections were incubated with a biotinylated secondary goat anti-rabbit IgG antibody (Dako) diluted 1:300 in PBS containing 2% normal rat serum (Dako). Immunoreactivity was detected using a streptavidin-biotin-peroxidase (Dako) technique, and diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako) was used as the chromogen.

Transgene detection. Circulating LEA29Y was detected using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Plates (Maxisorp; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with 50 µl at 2.5 µg/ml

of a mouse anti-human CTLA4 antibody (BNI3; Immunotech, Marseille, France). The plates were then incubated with a blocking solution (PBS, 0.1% Tween, 1% bovine serum albumin) and further incubated for 2 hours at 37°C with serial dilution of macaques sera in PBS, 0.1% Tween. After extensive washing, a biotin-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, UK) at 55 ng/ml was added and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. After washing the plates, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, California) at 1 µg/ml was added for 1 hour at 37°C. The reaction was developed using 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazolinesulfonate-6 (Roche Applied Science) and the absorbance of duplicate samples was read at 405 nm (MRX; Dynatech, Chantilly, Virginia). Recombinant LEA29Y were used to set up a standard curve showing linearity between 1 and 100 ng/ml of LEA29Y.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the personnel at the Boisbonne Centre (large animal facility) in Nantes and the Genethon in Evry, France for titrating the rAAV stocks. We also thank the Vector Core (<http://www.vectors.nantes.inserm.fr>) at the University Hospital of Nantes for providing the rAAV1 and rAAV8 stocks, Marie-Anne Colle, Gregory Jouvion, Thibaud Larcher (INSERM UMR 703, Nantes, France), Isabelle Rimbaud (INSERM UMR 649, Nantes, France) for their technical assistance, and André Lieber (University of Washington, Seattle, Washington) for providing nonhuman primate serum positive for interleukin-6 and tumor necrosis factor-α after systemic injection of recombinant adenovirus. Financial support was received from the INSERM, the INRA, the University Hospital of Nantes, the Fondation pour la Thérapie Génique en Pays de Loire, CLINIGENE (a European Network of Excellence) and the Association Française contre les Myopathies Award no. 13063. R.O.S. owns equity in a gene therapy company that is commercializing adeno-associated virus for gene therapy applications. This work was done in Nantes, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Detection of rAAV vector sequences by PCR and Southern blot in organs at the time of euthanasia.

Figure S1. *In situ* vector structure.

Materials and Methods.

REFERENCES

1. Arruda, VR, Stedman, HH, Nichols, TC, Haskins, ME, Nicholson, M, Herzog, RW *et al.* (2005). Regional intravascular delivery of AAV-2-FIX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* **105**:3458–3464.
2. Chao, H, Monahan, PE, Liu, Y, Samulski, RJ and Walsh, CE (2001). Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther* **4**: 217–222.
3. Favre, D, Blouin, V, Provost, N, Spisek, R, Porrot, F, Bohl, D *et al.* (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* **76**: 11605–11611.
4. Flotte, TR, Conlon, TJ, Poirier, A, Campbell-Thompson, M and Byrne, BJ (2007). 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* **18**: 245–256.
5. Herzog, RW, Mount, JD, Arruda, VR, High, KA and Lothrop, CD Jr (2001). Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* **4**: 192–200.
6. Kessler, PD, Podsakoff, GM, Chen, X, McQuiston, SA, Colosi, PC, Matelis, LA *et al.* (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14082–14087.
7. Rivera, VM, Gao, GP, Grant, RL, Schnell, MA, Zoltick, PW, Rozamus, LW *et al.* (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**: 1424–1430.
8. Riviere, C, Danos, O and Douar, AM (2006). Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* **13**: 1300–1308.
9. Ross, CJ, Twisk, J, Bakker, AC, Miao, F, Verbart, D, Rip, J *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**: 487–499.
10. Snyder, RO, Spratt, SK, Lagarde, C, Bohl, D, Kaspar, B, Sloan, B *et al.* (1997). Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* **8**: 1891–1900.

11. Wang, L, Cao, O, Swalm, B, Dobrzynski, E, Mingozzi, F and Herzog, RW (2005). Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther* **12**: 1453–1464.
12. Wang, L, Dobrzynski, E, Schlachterman, A, Cao, O and Herzog, RW (2005). Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood* **105**: 4226–4234.
13. Jiang, H, Pierce, GF, Ozelo, MC, de Paula, EV, Vargas, JA, Smith, P *et al.* (2006). Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* **14**: 452–455.
14. Kay, MA, Manno, CS, Ragni, MV, Larson, PJ, Couto, LB, McClelland, A *et al.* (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**: 257–261.
15. Manno, CS, Chew, AJ, Hutchison, S, Larson, PJ, Herzog, RW, Arruda, VR *et al.* (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963–2972.
16. Brantly, ML, Spencer, LT, Humphries, M, Conlon, TJ, Spencer, CT, Poirier, A *et al.* (2006). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 $\alpha 1$ -antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* **17**: 1177–1186.
17. Nierman, M, Twisk, J, Hermens, W, Bakker, A, Van Deventer, S, Rekke, B *et al.* (2007). Safety and efficacy of AMT-010, an adeno-associated virus-based gene therapy vector administered to lipoprotein lipase-deficient subjects. *Hum Gene Ther* **18**: 942.
18. Arruda, VR, Schuetttrumpf, J, Herzog, RW, Nichols, TC, Robinson, N, Lotfi, Y *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.
19. Chenuaud, P, Larcher, T, Rabinowitz, JE, Provost, N, Cherel, Y, Casadevall, N *et al.* (2004). Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* **103**: 3303–3304.
20. Gao, G, Leberer, C, Weiner, DJ, Grant, R, Calcedo, R, McCullough, B *et al.* (2004). Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* **103**: 3300–3302.
21. Herzog, RW, Fields, PA, Arruda, VR, Brubaker, JO, Armstrong, E, McClintock, D *et al.* (2002). Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther* **13**: 1281–1291.
22. Le Guiner, C, Stieger, K, Snyder, RO, Rolling, F and Moulhier, P (2007). Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther* **7**: 334–346.
23. Vandenberghe, LH, Wang, L, Somanathan, S, Zhi, Y, Figueredo, J, Calcedo, R *et al.* (2006). Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med* **12**: 967–971.
24. Wang, Z, Allen, JM, Riddell, SR, Gregorevic, P, Storb, R, Tapscott, SJ *et al.* (2007). Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **18**: 18–26.
25. Yuasa, K, Yoshimura, M, Urasawa, N, Ohshima, S, Howell, JM, Nakamura, A *et al.* (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther* **14**: 1249–1260.
26. Zhang, G, Budker, V, Williams, P, Subbotin, V and Wolff, JA (2001). Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* **12**: 427–438.
27. Su, LT, Gopal, K, Wang, Z, Yin, X, Nelson, A, Kozyak, BW *et al.* (2005). Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* **112**: 1780–1788.
28. Blankinship, MJ, Gregorevic, P, Allen, JM, Harper, SQ, Harper, H, Halbert, CL *et al.* (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther* **10**: 671–678.
29. Gao, GP, Alvira, MR, Wang, L, Calcedo, R, Johnston, J and Wilson, JM (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 11854–11859.
30. Wang, Z, Zhu, T, Qiao, C, Zhou, L, Wang, B, Zhang, J *et al.* (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**: 321–328.
31. Chenuaud, P, Larcher, T, Rabinowitz, JE, Provost, N, Joussemet, B, Bujard, H *et al.* (2004). Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **9**: 410–418.
32. Larsen, CP, Pearson, TC, Adams, AB, Tso, P, Shirasugi, N, Strobert, E *et al.* (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant* **5**: 443–453.
33. Salvetti, A, Oreve, S, Chadeuf, G, Favre, D, Cherel, Y, Champion-Arnaud, P *et al.* (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* **9**: 695–706.
34. Donsante, A, Miller, DG, Li, Y, Vogler, C, Brunt, EM, Russell, DW *et al.* (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**: 477.
35. Donsante, A, Vogler, C, Muzyczka, N, Crawford, JM, Barker, J, Flotte, T *et al.* (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* **8**: 1343–1346.
36. Manno, CS, Pierce, GF, Arruda, VR, Glader, B, Ragni, M, Rasko, JJ *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342–347.
37. Mingozzi, F, Liu, YL, Dobrzynski, E, Kaufhold, A, Liu, JH, Wang, Y *et al.* (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer. *J Clin Invest* **111**: 1347–1356.
38. Mingozzi, F and High, KA (2007). Immune Responses to AAV in Clinical Trials. *Curr Gene Ther* **7**: 316–324.
39. Zhu, T, Zhou, L, Mori, S, Wang, Z, McTiernan, CF, Qiao, C *et al.* (2005). Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation* **112**: 2650–2659.
40. Thomas, CE, Storm, TA, Huang, Z and Kay, MA (2004). Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* **78**: 3110–3122.
41. Brockstedt, DG, Podsakoff, GM, Fong, L, Kurtzman, G, Mueller-Ruchholtz, W and Engleman, EG (1999). Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* **92**: 67–75.
42. Vandenberghe, LH and Wilson, JM (2007). AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther* **7**: 325–333.
43. Arruda, VR, Hagstrom, JN, Deitch, J, Heiman-Patterson, T, Camire, RM, Chu, K *et al.* (2001). Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* **97**: 130–138.
44. Lasne, F, Martin, L, de Ceaurriz, J, Larcher, T, Moulhier, P and Chenuaud, P (2004). “Genetic Doping” with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther* **10**: 409–410.
45. Vincent-Lacaze, N, Snyder, RO, Gluzman, R, Bohl, D, Lagarde, C and Danos, O (1999). Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol* **73**: 1949–1955.
46. Ge, Y, Powell, S, Van Roey, M and McArthur, JG (2001). Factors influencing the development of an anti-factor IX (FIX) immune response following administration of adeno-associated virus-FIX. *Blood* **97**: 3733–3737.
47. Wang, Z, Kuhr, CS, Allen, JM, Blankinship, M, Gregorevic, P, Chamberlain, JS *et al.* (2007). Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* **15**: 1160–1166.
48. Li, C, Hirsch, M, Asokan, A, Zeithaml, B, Ma, H, Kafri, T *et al.* (2007). Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid *in vivo*. *J Virol* **81**: 7540–7547.
49. Li, H, Murphy, SL, Giles-Davis, W, Edmonson, S, Xiang, Z, Li, Y *et al.* (2007). Pre-existing AAV capsid-specific CD8+ T cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes. *Mol Ther* **15**: 792–800.
50. Wang, L, Figueredo, J, Calcedo, R, Lin, J and Wilson, JM (2007). Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Hum Gene Ther* **18**: 185–194.

Table S1: Detection or rAAV vector sequences by PCR and Southern-Blot in organs at the time of euthanasia.

	Mac 1	Mac 2	Mac 3	Mac 4	Mac 5	Mac 6	Mac 7	Mac 8
Axillary lymph node R	+	+	+	++	+	+	+	+
Axillary lymph node L	+	+	+	++	++	+	-	+
Deep inguinal lymph node R	++	+	+	NA	++	++	+	++
Deep inguinal lymph node L	+	+	++	++	+	+	-	+
Lomboarctic lymph node R	NA	+	++	NA	++	++	++	++
Lomboarctic lymph node L	NA	+	++	NA	++	+	+	+
Mesenteric lymph node	++	++	++	++	+	+	+	+
Popliteal lymph node R	NA	NA	++	++	NA	++	+	++
Popliteal lymph node L	NA	NA	++	+	NA	+	++	+
Retropharyngeal lymph node R	NA	NA	++	NA	+	+	+	+
Retropharyngeal lymph node L	NA	NA	++	++	-	+	+	++
Submandibular lymph node R	+	+	+	++	+	+	+	+
Submandibular lymph node L	+	+	++	++	+	+	+	+
Bronchiotracheal lymph node	+	+	++	++	+	+	++	++
Prescapular lymph node R	-	+	NA	NA	-	-	+	+
Prescapular lymph node L	+	+	NA	NA	+	+	+	+
Superficial inguinal lymph node R	+	-	NA	NA	++	++	+	++
Superficial inguinal lymph node L	+	+	NA	NA	+	+	++	+
Third eyelid R	+	-	+	NA	-	+	+	+
Third eyelid L	+	NA	+	NA	-	+	+	+
Bone marrow	+	+	++	+	-	-	+	-
PBMC	+	+	+	+	-	+	-	-
Frontal cortex R	+	+	++	+	+	-	+	+
Frontal cortex L	+	+	+	+	+	-	+	-
Thalamus R	+	-	+	+	+	+	+	-
Thalamus L	-	-	+	+	+	+	+	-
Caudate nucleus R	+	+	+	+	+	-	-	-
Caudate nucleus L	+	+	+	+	+	-	+	+
Bulbe R	+	+	++	NA	+	+	-	-
Bulbe L	+	-	+	NA	-	-	+	-
Dorsal cervical spinal chord R	+	+	+	++	+	+	-	-
Ventral cervical spinal chord R	+	+	+	++	+	-	+	-
Dorsal cervical spinal chord L	+	+	+	++	+	-	+	+
Ventral cervical spinal chord L	+	+	+	++	+	-	+	-
Dorsal thoracic spinal chord R	+	-	+	NA	-	-	+	-
Ventral thoracic spinal chord R	+	+	+	NA	+	-	+	-
Dorsal thoracic spinal chord L	-	+	+	NA	+	-	+	-
Ventral thoracic spinal chord L	+	+	+	NA	-	-	+	-
Dorsal lumbar spinal chord R	+	+	+	++	+	-	+	+
Ventral lumbar spinal chord R	+	+	+	++	-	+	+	-
Dorsal lumbar spinal chord L	+	+	+	++	-	+	+	-
Ventral lumbar spinal chord L	+	+	+	++	+	-	+	+
Brachial plexus R	+	+	+	+	+	+	+	+
Brachial plexus L	+	+	+	+	+	-	+	-
Sciatic nerve R	+	+	++	++	-	-	+	++
Sciatic nerve L	+	+	+	+	-	-	++	-
Diaphragm	+	+	+	+	+	+	-	+
Heart	+	+	+	++	+	+	++	+
Testis L	+	-	+	+	-	-	+	-
Seminal vesicle	-	-	+	NA	+	-	+	-
Prostate	-	-	NA	NA	NA	NA	-	NA
Thymus	+	-	++	NA	-	NA	++	-
Adrenal gland R	++	NA	++	++	+	++	++	-
Adrenal gland L	++	+	++	++	+	++	++	+
Thyroid gland R	+	-	+	++	-	+	++	+
Thyroid gland L	+	+	+	NA	-	-	-	-
Parotid gland R	-	-	+	+	-	+	-	-
Parotid gland L	-	-	+	+	-	-	-	-
Tonsil R	-	-	+	+	+	-	-	+
Tonsil L	+	-	+	+	-	-	-	+
Liver	++	++	++	++	++	++	++	++
Spleen	++	++	++	++	+	++	+	+
Lung	+	-	+	++	-	+	+	-
Aorta	+	++	+	NA	+	+	-	+
Kidney R	++	++	++	++	++	++	+	++
Kidney L	++	++	++	++	+	++	+	++
Oesophagus	+	-	++	++	+	-	+	-

Colon	+	+	+	+	-	-	-	-
Duodenum	-	+	+	NA	-	-	-	-
Stomach	-	-	-	+	-	-	-	-
Ileum	+	++	+	++	-	-	+	+
Jejunum	+	-	+	NA	-	-	-	-
Pancreas	-	+	+	++	-	-	+	+
Rectum	+	+	+	++	+	+	-	-
Bladder	+	+	++	NA	+	-	+	+
Tongue	+	-	++	++	+	+	++	-
Trachea	-	+	++	++	-	+	++	+
Skin	-	-	+	++	-	+	-	-
Bone	+	-	++	++	+	++	++	++
Articular capsule	++	+	++	NA	-	++	++	-
Meniscus	+	-	++	NA	+	++	++	+

Total DNA was extracted and PCR/Southern-blot analysis were carried out as described in Material & Methods. L: left, R: right. NA: not available. (-) negative signal. (+) positive signal after PCR + Southern-blot analysis. (++) positive signal after PCR analysis.

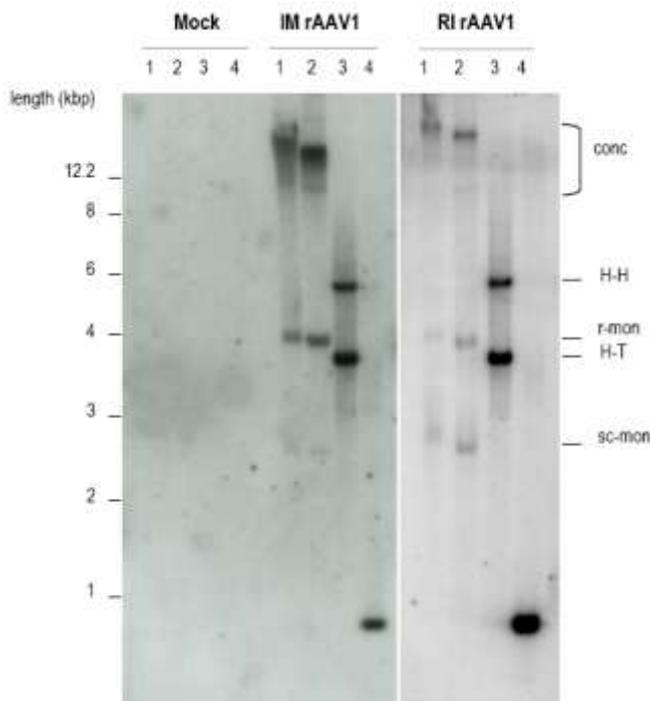


Figure S1: *In situ* vector structure. Twenty micrograms of total DNA purified from primate muscle were incubated either (1) in the absence of any restriction enzyme or (2) with XbaI (no cutting site within the vector), (3) EcoRI (one site within the vector), or (4) BamHI/ClaI (two cuts in the vector). Southern-blot realized from a non-injected (Mock) and injected (IM rAAV1 and RI rAAV1) muscles after hybridized with the ³²P-labeled WPRE-pA probe that is specific of the rAAV. H-H and H-T indicate respectively head-to-head or head-to-tail junctions. ds monomer: double-stranded monomer.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

***In situ* vector structure analysis:** Twenty micrograms of total cellular DNA extracted from primate muscles were digested twice for 3h at 37°C with 2.5U/μg of each restriction enzyme: XbaI; EcoRI; BamHI/ClaI engendering 0-, 1- or 2- cuts respectively in the vector. The samples were run on a 0.8% agarose gel in TAE for 16h at 35V at room temperature. Gels were then stained with ethidium bromide and photographed. After depurination in HCl 0.25N, DNA was transferred on membrane under denaturing conditions. Southern-blotting was performed by using the WPRE-pA probe, which is an 867-bp fragment labeled with [α -³²P]dCTP.

Deuxième article

*Intramuscular (IM) as opposed to regional intravenous (RI) delivery
of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle
results in immunotoxicity*

**Alice Toromanoff, Oumeya Adjali, Thibaut Larcher, Marcelo Hill,
Lydie Guigand, Pierre Chenuaud, Jack-Yves Deschamps, Olivier
Gauthier, Gilles Blancho, Bernard Vanhove, Fabienne Rolling, Yan
Chérel, Philippe Moullier, Ignacio Anegon, Caroline Le Guiner.**

Article en cours de rédaction

Comme présenté précédemment, les études menées au laboratoire sur la régulation Tet-On chez le primate après injection IM d'un AAVr codant le gène rapporteur cmEpo a montré que 90% des animaux développaient une réponse humorale et cellulaire dirigée contre le transactivateur rtTA, responsable de la perte d'expression d'Epo suite à la destruction des fibres musculaires transduites (Favre *et al.*, 2002; Le Guiner *et al.*, 2007). La persistance à long terme de la régulation avec le système Tet-On est toutefois possible chez les primates ne présentant pas de réponse immunitaire après le transfert de gène. Après une unique injection de vecteur, la régulation de l'expression du transgène Epo est en effet possible pendant au moins 5 ans (Favre *et al.*, 2002; Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

Nous avons émis l'hypothèse que la mise en place d'une immunosuppression des animaux pourrait prévenir le développement de la réponse immune contre le rtTA. La molécule choisie est le LEA29Y décrit auparavant. Cette molécule humaine est active chez le macaque. Elle permet d'inhiber la réponse humorale suite à une immunisation par des globules rouges de mouton (SRBC) et augmente le délai de rejet d'allogreffe de rein (Larsen *et al.*, 2005). Il est donc pertinent de penser que cette molécule immunosuppressive puisse bloquer une réponse immunitaire anti-transgène (humorale et cellulaire).

Pour des raisons pratiques et financières, nous avons apporté la molécule LEA29Y par transfert de gène à l'aide d'AAVr. Ainsi, les animaux ont exprimé stablement l'immunosuppresseur tout au long de l'étude, après une unique injection. Afin d'obtenir différents taux d'expression du LEA29Y dans la circulation, les animaux ont reçu le vecteur soit par IM, soit par RI, à l'aide d'un AAVr de sérotype 1 ou d'un sérotype 8 (ces sérotypes transduisant efficacement le tissu musculaire (Chenuaud *et al.*, 2004b; Gao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005c)). Une fois la concentration sérique en LEA29Y stabilisée, les animaux ont reçu par voie IM un second vecteur AAVr d'un sérotype différent du premier : le vecteur AAVr-cmEpo/rtTA décrit par Chenuaud *et al.* (Chenuaud *et al.*, 2004b). L'expression du transgène Epo a ensuite été suivie sur plusieurs mois aux cours d'inductions successives à la Dox par mesure du taux de réticulocytes et dosage de l'Epo sérique par ELISA selon le protocole décrit auparavant (Chenuaud *et al.*, 2004b).

Les résultats de cette étude font actuellement l'objet de la rédaction d'un article qui sera soumis très prochainement pour publication. La partie « Résultats » de cet article est présenté ci-après.

Intramuscular (IM) as opposed to regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle results in immunotoxicity.

Alice Toromanoff¹, Oumeya Adjali¹, Thibaut Larcher², Marcelo Hill⁴, Lydie Guigand², Pierre Chenuaud¹, Jack-Yves Deschamps², Olivier Gauthier³, Gilles Blancho⁴, Bernard Vanhove⁴, Fabienne Rolling¹, Yan Chérel², Philippe Moullier^{1,5,6}, Ignacio Anegón⁴, Caroline Le Guiner¹

- (1) INSERM UMR 649, CHU Nantes, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France
- (2) INRA UMR 703, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France
- (3) Service de Chirurgie, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes, France
- (4) INSERM UMR 643, CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France
- (5) EFS Pays de la Loire, Nantes, France
- (6) Department of Molecular Genetics and Microbiology department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Correspondence should be addressed to C.L.G. (caroline.le-guiner@univ-nantes.fr).
This work was done in Nantes, FRANCE.

Corresponding author: Caroline Le Guiner, INSERM UMR 649, Bâtiment Jean Monnet, CHU Hôtel-Dieu, 30 Boulevard Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. Telephone: (33) 2-40-08-74-90. Fax: (33) 2-40-08-74-91. Email: caroline.le-guiner@univ-nantes.fr

Short title: Immunotoxicity of intramuscular rAAV delivery.

RESULTS

First challenge with a rAAV-LEA29Y.

Our first aim was to achieve immunosuppressive levels of LEA29Y in the serum of our 8-macaques cohort. Therefore two different AAV serotypes (AAV1 and AAV8) and two different mode of delivery (IM and RI) were used to determine the optimal protocol. The first four NHP (Mac 1, Mac 2, Mac 3 and Mac 4) received rAAV1 while the next four NHP (Mac 5, Mac 6, Mac 7 and Mac 8) received rAAV8 vector. Within each of the two-serotype groups, two individuals had the rAAV vector administered either by IM (Mac 1, Mac 2, Mac 5 and Mac 6) or RI (Mac 3, Mac 4, Mac 7 and Mac 8) (**Table 1** and (Toromanoff *et al.*, 2008)). Transgene expression was monitored in the serum of each animal at different time points. More than a year following the injection, the two macaques that received the rAAV1 vector by IM had an average of 15 µg/ml of LEA29Y per mL of serum, whereas all the other animals expressed between 50 and 100 µg of LEA29Y per mL of serum (Toromanoff *et al.*, 2008). These LEA29Y levels are considered as being well within the therapeutically range of the molecule (Larsen *et al.*, 2005).

We, then, assessed the immune status of each individual. First, we confirmed that the LEA29Y encoded by the rAAV vector was able to inhibit a mixed lymphocyte reaction of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (data not shown). Next, to assess the *in vivo* efficacy of the secreted LEA29Y, mock and rAAV-injected macaques (except Mac 5, for which the immunization have not been done) were immunized with sheep red blood cells (SRBC). Few weeks later, antibodies against SRBC were detected in the serum of the control animals (n=2), whereas none or low levels were detected in serum of rAAV-LEA29Y transduced animals (**Supplementary figure 1**). To explore the cellular immune status of the cohort, all mock and rAAV-injected macaques received a skin allograft after major histocompatibility genotyping (data not shown) to evaluate the cellular immune response status. We found that all injected macaques rejected the graft, however with a small but significant delay ($P=0.03$, analysis of variance) (**Supplementary figure 2**). Altogether, these results confirmed that LEA29Y produced after vector delivery was able to suppress the humoral response and to a much lesser extend the cellular immune reaction.

To characterize the transduction pattern of each group and subgroup, muscle biopsies were obtained 5 weeks after the injection. One biopsy was carried out at one of the pre-tattooed sites of rAAV IM injection. Because transduction was expected to be more dispersed after RI delivery, biopsies were obtained from the gastrocnemius, the tibialis anterior, the biceps femoris and the sartorius. The transgene DNA was confirmed by quantitative PCR in all biopsies from all rAAV1- and rAAV8 injected animals (Toromanoff *et al.*, 2008). Surprisingly and despite the lack of detection of an innate immune response at early time points post vector injection (Toromanoff *et al.*, 2008), we found that, regardless of the rAAV serotype, all animals in the IM group exhibited focal inflammatory infiltrates frequently but not exclusively around transgene-expressing myofibers (**Figure 1A**). Conversely, in the RI group, none of the biopsies showed inflammatory infiltrates even in areas where LEA29Y could be detected by immunofluorescence (**Figure 1B**). The same observations were made at 11 and 22 months post rAAV delivery (data not shown). Using CD3, CD4, CD8 (T cells) and CD79a (B cells) markers, we found that the muscle infiltrates were primarily made of CD8 T lymphocytes (**Figure 1C to F**).

To further characterize the muscle pathology 5 weeks post IM delivery of rAAV, we performed RNA *in situ* hybridization (ISH) using an antisense probe specific for the WPRE sequence. Fig.2A shows strong accumulations of WPRE messengers in transduced myofibers after IM delivery (see also **Supplementary figure 3**). As a control, no signal was found with the sense probe (Fig.2A inlet). Accordingly, immunohistochemical staining using an anti-CTLA4 antibody showed LEA29Y expression co-localizing with the ISH-positive cells (compare **Figure 2A and 2C**). Interestingly, the same fibers expressed on the cell surface, high levels of Major-Histo-Compatibility (MHC) class I molecules (**Figure 2E**) and the complement-derived membrane attack complex (MAC) (**Figure 2G**). Conversely, in the RI was the delivery method, the signal for the WPRE messengers was significantly weaker using the antisense probe, but was detected in all fibers on the biopsy samples (**Figure 2B and Supplementary figure 3**). No signal was found after incubation with the sense probe (Fig.2B inlet). However, this expression level was not sufficient to allow the immunohistochemical detection of LEA29Y-positive fibers (**Figure 2D**). This was also correlated to the lack of detection of class I MHC and MAC expression on the surface of the myofibers (**Figure 2F and 2H**). Overall this ISH pattern is consistent with the low and high number of vector genome copies per cell found after vector delivery by respectively RI and IM (Toromanoff *et al.*, 2008). Altogether, these results indicate that after IM, not RI, delivery of rAAV1 or rAAV8 vector results in: (i) high local concentration of the transgene product, (ii) over-expression of class I MHC molecules at the genetically-modified myofiber cell surface, and (iii) co localization of the MAC with transgene and class-I MHC over expressing myofibers.

Because muscle pathology with respect to the host immune reaction was so impressively different between the RI and the IM groups, we further looked by ELISA for the presence of anti AAV capsid IgG antibodies in the serum of all eight NHP. Three months post-rAAV administration, we found that the IM-injected animals produced high titers of anti-capsid antibodies, and this, regardless of the serotype administered. In contrast, the RI group showed an insignificant humoral response (**Figure 3**). These results, both in the RI and IM groups, were independent of the LEA29Y levels found in the serum. Furthermore the same difference in humoral response was obtained when we looked for the presence of neutralizing antibodies against the AAV capsid; i.e. high levels of neutralizing antibodies were found in the IM group sera and low to undetectable levels in the RI ones (data not shown). These results are consistent with the pathology findings and strengthen the idea that IM, as opposed to RI, is an efficient route of delivery to trigger the host immune system despite immunosuppression.

Second challenge with a rAAV-rtTA/EPO.

To test if the levels of LEA29Y achieved could impact on our rtTA/Epo antigenic model in which 90% of the animals develop a humoral and cellular immune response against the doxycycline sensitive rtTA transactivator along with loss of Epo induction after Dox administration (Chenuaud *et al.*, 2004b; Favre *et al.*, 2002), and unpublished data), we used the same administration protocol that we previously described (Chenuaud *et al.*, 2004b; Favre *et al.*, 2002). Briefly, all eight individuals received the rAAV-rtTA/EPO vector (Chenuaud *et al.*, 2004b). This vector contains two expression cassettes cloned in the same direction (forward orientation): i) the first one encodes for Epo followed by the WPRE sequence driven by the minimal CMV promoter; ii) the second one encodes for the transactivator rtTA-M2 driven by the desmin promoter. When LEA29Y serum levels stabilized between 3 to 9 months post injection, the serotype 1 or alternatively -8 rAAV vector (depending on the presence of neutralizing antibodies) was administered by IM at doses ranging from 2×10^{11} to 1×10^{12} vg/kg (**Table 1**).

Two months after rAAV-rtTA/EPO administration, Dox induction cycles were initiated for 3 days every month and Epo secretion monitored by ELISA (Stieger *et al.*, 2006). As shown in **Table 1** and **Figure 4**, and consistent with our previous studies, Mac 1, Mac 2, Mac 5, and Mac 6 had lost Epo secretion ability after only 1 to 5 Dox induction cycles, whereas Mac 7 remained inducible until the 8th Dox-induction cycle and the remaining primates, Mac 3, Mac 4 and Mac 8 showed persisting Epo-induction capacity. Based on our experience in this model, these declining ability to induce Epo secretion upon Dox administration is correlated with the establishment of a humoral and cellular immune response against the rtTA (Favre *et al.*, JVI 2002). Indeed, anti-rtTA antibodies were detectable by Western-blot in Mac 1, Mac 2, Mac 5, Mac 6 and Mac 7 sera, 1 month prior the decline of Epo expression became significant. Interestingly, the lack of detectable anti-rtTA antibodies is a persisting feature in Mac 3, Mac 4 and Mac 8 (**Table 1** and **Figure 4**). Furthermore, all eight NHP were subjected a muscle biopsy at the site of rAAV-rtTA/Epo vector injection (the opposite leg where the rAAV-LEA29Y vector was injected), and we found lymphomonocytic infiltrates with destructions of myofibers and significant architectural tissue rearrangements (Favre *et al.*, 2002) only in the non-responsive individuals (**Table 1**).

In conclusion, despite therapeutic levels of circulating LEA29Y, an immune response against the rtTA transactivator was observed in several animals independent of the LEA29Y level and the rAAV-rtTA/EPO vector dose administered (**Table 1**). However, there is an obvious correlation between the IM route of delivery when the primates received the first rAAV vector and the systematic occurrence of an immune response against the rtTA expressed from the second rAAV vector. Conversely, when the first vector was administered by RI, the anti rtTA response was either delayed in one case or absent in the remaining three

cases. Altogether, these IM results indicate this delivery route of rAAV vector in NHP promotes a vaccination-type of reaction whereas the RI data suggest the induction of some form of tolerance/ignorance since the second administration of rAAV by IM resulted in permanent transgene expression in 3/4 animals.

RI delivery of a rAAV-rtTA/EPO, without immunosuppression.

To confirm that RI route of AAV delivery promotes a non-responding status of the host immune system to the rtTA transgene, three naïve macaques (Mac 19, Mac 20, Mac 21) received the rAAV1 rtTA-EPO vector by RI, in the absence of any immunosuppressive regiment.

As in the first 8-individual cohort, the protocol consisted in measuring Epo concentration after repeated Dox inductions every month. Interestingly, 100% of animals (n=3) showed a persistent ability to induce Epo secretion after Dox exposure for at least 7 months following vector administration. Accordingly, none of the NHP showed detectable anti-rtTA antibodies (**Figure 5** and **Table 2**). In contrast, when the same rAAV1 vector was administered via the IM route in a previous study (Chenuaud *et al.*, 2004b) using the same protocol and without immunosuppression, only one individual out four showed a persisting Epo-induction capacity. Indeed, the other three macaques had lost Epo expression following the first or the second induction cycle. Here too, this decline was concomitant with the presence of anti-rtTA antibodies in serum and the presence of muscle infiltrates at the site of vector injection (**Table 2**).

Finally, we also performed several muscle biopsies on Mac 19, mac 20 and Mac 21 7 months following vector infusion. In four different muscle biopsies taken randomly, no sign of neither inflammation nor myofiber destruction could be seen (**Table 2**).

Altogether, these results confirm that RI delivery is able to avoid the host immune reaction at least in our rtTA antigenic model whereas IM results most of the time in antigen recognition and loss of transgene expression.

REFERENCES

- CHENUAUD, P., T. LARCHER, J.E. RABINOWITZ, N. PROVOST, B. JOUSSEMET, H. BUJARD, R.J. SAMULSKI, D. FAVRE, and P. MOULLIER. 2004. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther.* 9:410-8.
- FAVRE, D., V. BLOUIN, N. PROVOST, R. SPISEK, F. PORROT, D. BOHL, F. MARME, Y. CHEREL, A. SALVETTI, B. HURTREL, J.M. HEARD, Y. RIVIERE, and P. MOULLIER. 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.
- KNAPP, L.A., L.F. CADAVID, M.E. EBERLE, S.J. KNECHTLE, R.E. BONTROP, and D.I. WATKINS. 1997. Identification of new mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing. *Immunogenetics.* 45:171-9.
- LARSEN, C.P., T.C. PEARSON, A.B. ADAMS, P. TSO, N. SHIRASUGI, E. STROBERTM, D. ANDERSON, S. COWAN, K. PRICE, J. NAEMURA, J. EMSWILER, J. GREENE, L.A. TURK, J. BAJORATH, R. TOWNSEND, D. HAGERTY, P.S. LINSLEY, and R.J. PEACH. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant.* 5:443-53.
- STIEGER, K., G. LE MEUR, F. LASNE, M. WEBER, J.Y. DESCHAMPS, D. NIVARD, A. MENDES-MADEIRA, N. PROVOST, L. MARTIN, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2006. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther.* 13:967-75.
- TOROMANOFF, A., Y. CHEREL, M. GUILBAUD, M. PENAUD-BUDLOO, R.O. SNYDER, M.E. HASKINS, J.Y. DESCHAMPS, L. GUIGAND, G. PODEVIN, V.R. ARRUDA, K.A. HIGH, H.H. STEDMAN, F. ROLLING, I. ANEGON, P. MOULLIER, and C. LE GUINER. 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.

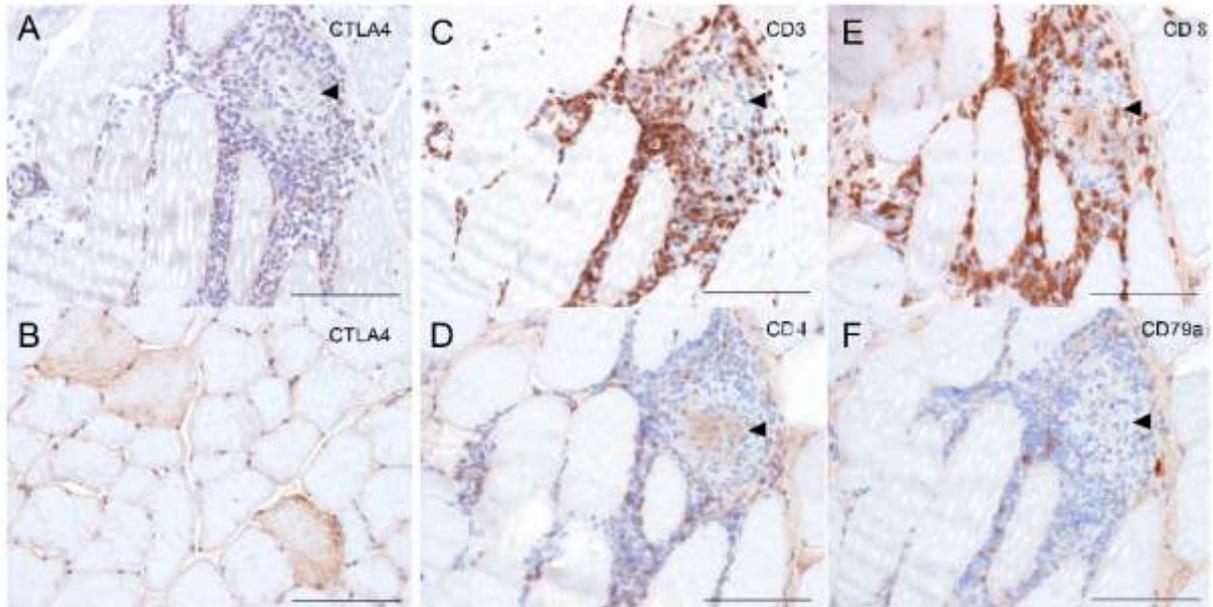


Figure 1: Immunostaining of rAAV-LEA29Y-injected muscles 5 weeks after rAAV delivery. Samples obtained from muscle biopsies. CTLA4 staining of (A) rAAV1-IM-injected muscle (cryosection obtained at the injection site from Mac 1) and of (B) rAAV1-RI-injected muscle (cryosection obtained in the gastrocnemius from Mac 3). Phenotypic characterization of the cellular infiltrates of the rAAV1-IM-injected muscle: (C) anti-CD3; (D) anti-CD4; (E) anti-CD8; (F) anti-CD79a. Scale bar = 100 μ m.

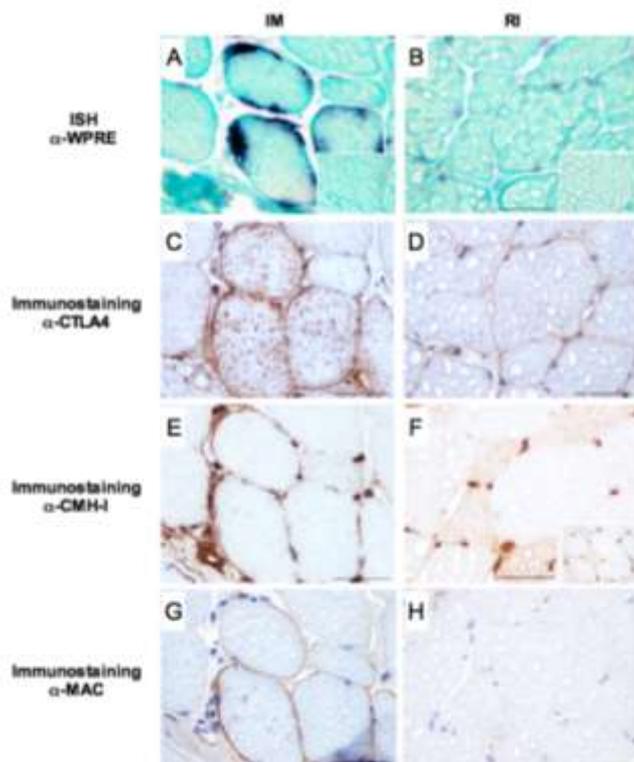


Figure 2:

In situ hybridization and immunostaining of rAAV-LEA29Y-injected muscles 5 weeks after rAAV delivery. (A), (C), (E) and (G): rAAV1-IM-injected muscle (cryosection obtained at the injection site from Mac 1). (B), (D), (F) and (H): rAAV1-RI-injected muscle (cryosection obtained in the gastrocnemius from Mac 3). (A) and (B) *In situ* hybridization with an antisense WPRE probe. Inserts = *In situ* hybridization of the same section with a sense WPRE probe. (C) and (D): CTLA4 staining. (E) and (F): CMH-I staining. Insert in (F) = CMH-I staining of a non-injected muscle. (G) and (H): Membrane attack complex (MAC) staining. Scale bar = 100 μ m.

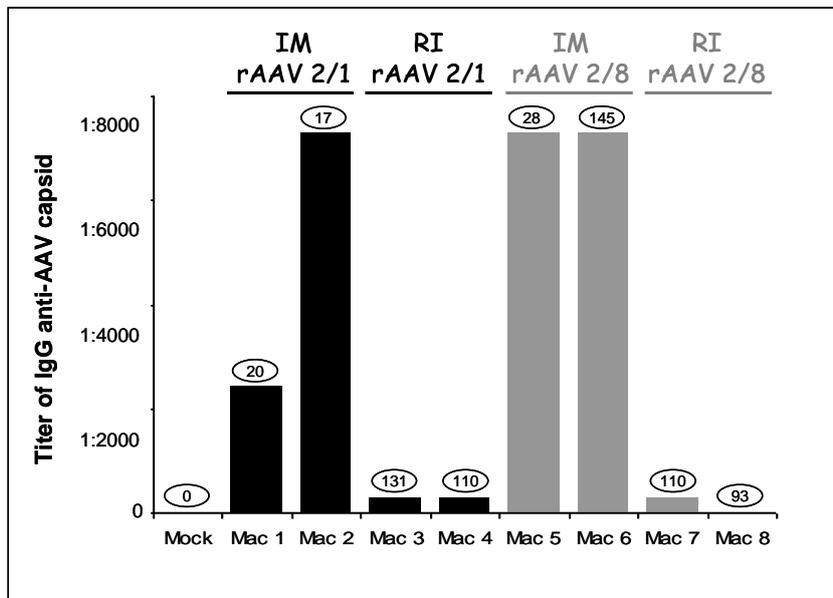


Figure 3:

Serum antibody titers for AAV1 or AAV8 capsid 3 months after gene transfer. Serum samples are obtained from mock-injected or rAAV-LEA29Y-injected macaques. Serum LEA29Y concentration values ($\mu\text{g}/\text{mL}$) at this time-point are shown within circles for each animal.

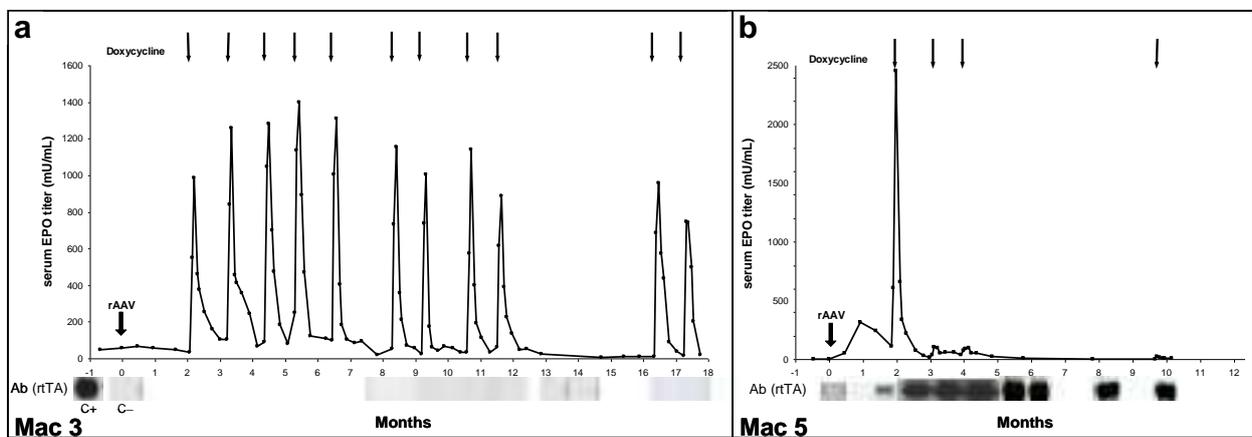


Figure 4: Serum Epo level in representative animals Mac 3 (a) and Mac 5 (b). Solid arrows represent Doxycycline administration. Ab(rtTA): detection of anti-rtTA antibodies in successive serum samples by Western-blot analysis; c+: positive control consisting in a commercial specific MAb against rtTA; c-: negative control obtained from sera prior to rAAV administration.

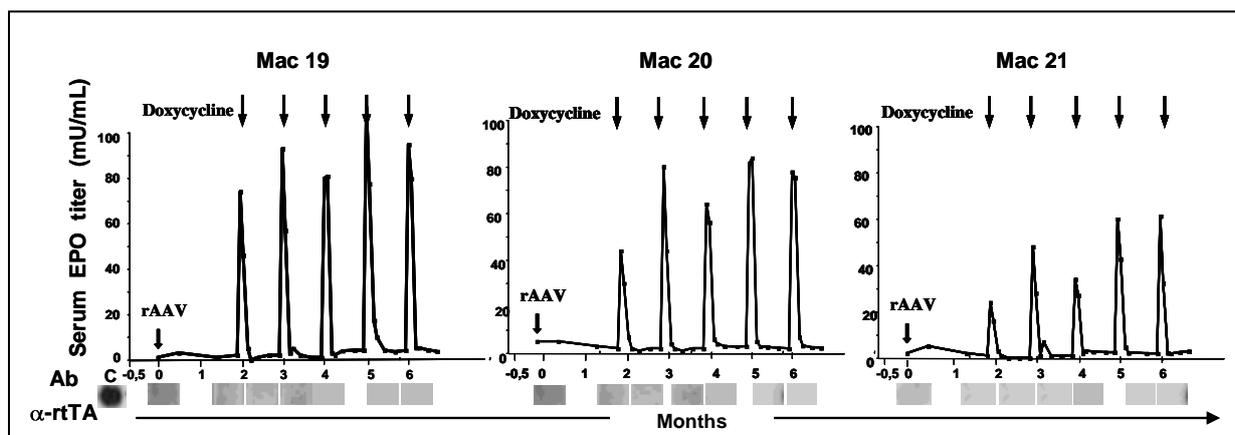


Figure 5: Serum Epo level in Mac 19 through 21, injected via RI with a rAAV-rtTA/Epo vector. Solid arrows represent Doxycycline administration. Ab(rtTA): detection of anti-rtTA antibodies in successive serum samples by Western-blot analysis; c+: positive control consisting in a commercial specific MAb against rtTA; c-: negative control obtained from sera prior to rAAV administration.

Table 1: Characteristic of the rAAV doses injected, muscle infiltrates and Epo regulation outputs in our first cohort of macaques (Mac 1 through 8).

Animal	1 st CHALLENGE				2 nd CHALLENGE					
	rAAV-LEA29Y				rAAV-rtTA/EPO					
	Serotype	Injected dose (vg/kg)	Mode of delivery	Muscle infiltrates	Serotype	Injected dose (vg/kg)	Mode of delivery	Anti-rtTA antibodies	Muscle infiltrates	Number of EPO successful induction cycles
Mac 1	rAAV1	5x10 ¹²	IM	+	rAAV8	7x10 ¹¹	IM	+	+	4
Mac 2	rAAV1	5x10 ¹²	IM	+	rAAV8	7x10 ¹¹	IM	+	+	5
Mac 5	rAAV8	5x10 ¹²	IM	+	rAAV1	2x10 ¹¹	IM	+	+	1
Mac 6	rAAV8	5x10 ¹²	IM	+	rAAV1	2x10 ¹¹	IM	+	+	3
Mac 3	rAAV1	5x10 ¹²	RI	-	rAAV8	7x10 ¹¹	IM	-	-	Persisting
Mac 4	rAAV1	5x10 ¹²	RI	-	rAAV8	2x10 ¹²	IM	-	-	Persisting
Mac 7	rAAV8	5x10 ¹²	RI	-	rAAV1	1x10 ¹¹	IM	+	+	7
Mac 8	rAAV8	5x10 ¹²	RI	-	rAAV8	1x10 ¹²	IM	-	-	Persisting

Table 2: Characteristic of the rAAV doses injected and Epo regulation outputs in the macaques injected with the rAAV-rtTA/EPO vector, without immunosuppression (Mac 13 through 21). nd = non determined.

Animal	Mode of delivery	Injected dose (vg/kg)	Anti-rtTA antibodies	Muscle infiltrates	Number of EPO successful induction cycles
Mac 13	IM	6,7x10 ¹¹	+	nd	Persisting
Mac 14	IM	6,7x10 ¹¹	+	+	1
Mac 15	IM	2,4x10 ¹⁰	+	+	3
Mac 16	IM	2,4x10 ¹⁰	+	+	2
Mac 19	RI	1x10 ¹¹	-	-	Persisting
Mac 20	RI	1x10 ¹¹	-	-	Persisting
Mac 21	RI	1x10 ¹¹	-	-	Persisting

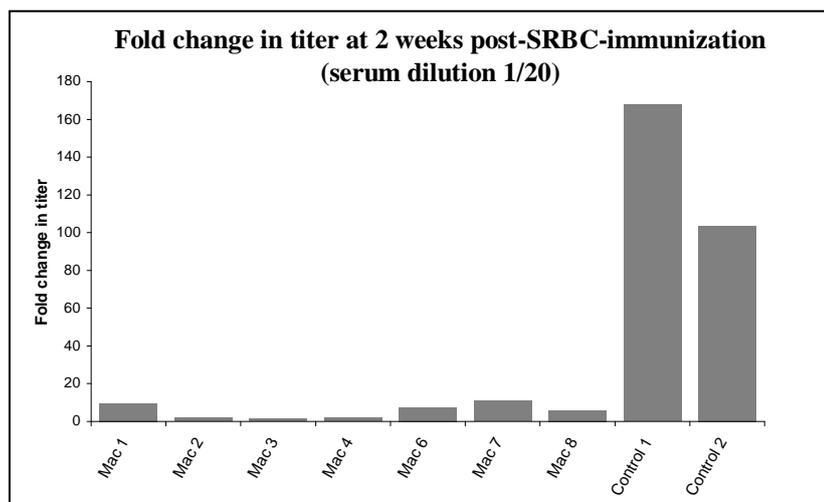


Figure S1: Effect of LEA29Y on T cell-dependent humoral immune response in cynomolgus monkeys. SRBC-specific IgG antibody response analyzed by flow cytometry 2 weeks after IV immunization. The fold change in titer was calculated using the mean of serum obtained 2 weeks pi divided by the mean of serum obtained just before immunization. Mac 1-8: rAAV-LEA29Y-injected macaques. Control 1-2: healthy immunized macaques.

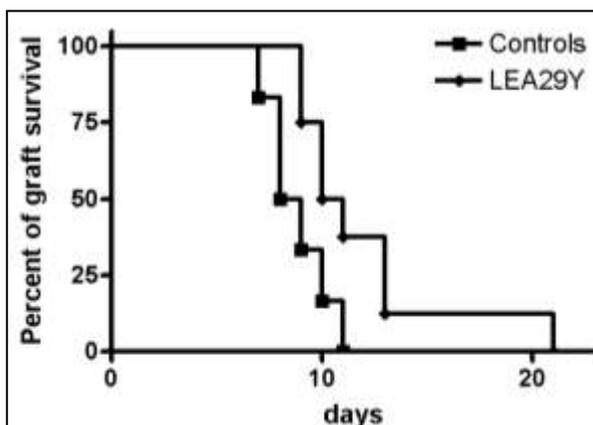


Figure S2: Effect of LEA29Y on cellular immune response in cynomolgus monkeys: Kaplan-Meier graft survival control versus rAAV-LEA29Y injected macaques. Mac1-8 and 4 healthy macaques received skin allo-graft from incompatible healthy donors. MHC genotyping confirmed the mismatch among the cohort.

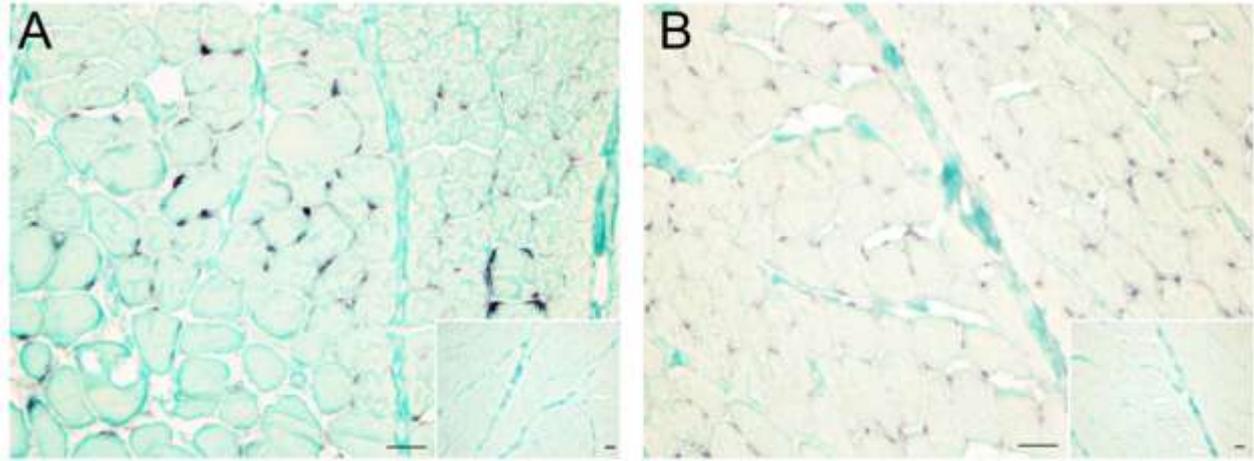


Figure S3: *In situ* hybridization of rAAV-LEA29Y-injected muscles 5 weeks after rAAV delivery. *In situ* hybridization with an antisens WPRE probe of (A) rAAV1-IM-injected muscle (cryosection obtained at the injection site from Mac 1) and of (B) rAAV1-RI-injected muscle (cryosection obtained in the gastrocnemius from Mac 3). Inserts = *In situ* hybridization of the same section with a sens WPRE probe. Scale bar = 100µm.

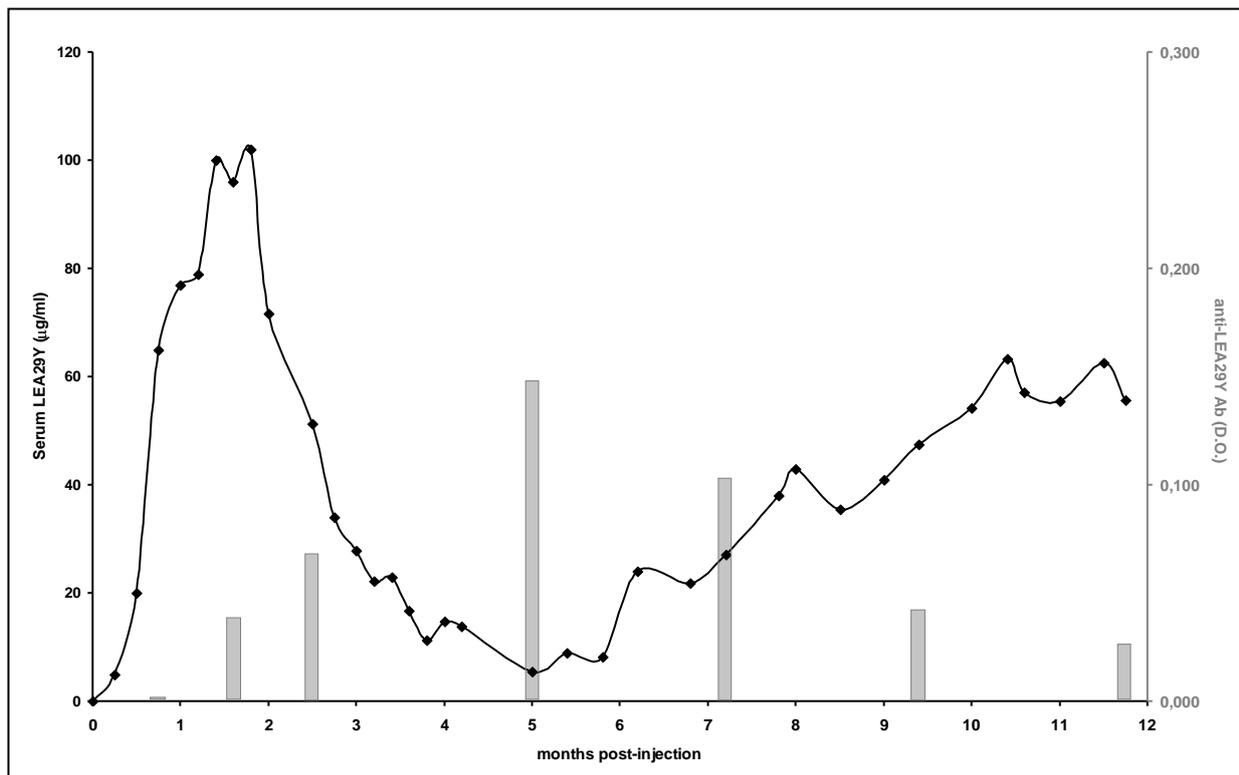


Figure S4: Kinetic of serum levels of LEA29Y and anti-LEA29Y antibodies in rAAV8-IM-injected Mac 5. Black curve represent LEA29Y levels. Anti-LEA29Y antibodies are shown with grey bar chart at the time-point they were determined.

MATERIALS AND METHODS

Vector production. The LEA29Y vector plasmid was generated as describe recently (Toromanoff *et al.*, 2008). The rtTA/Epo vector plasmid contained (i) the cynomolgus macaque Epo cDNA under the control of the TetO-CMV promoter, and in the forward orientation (ii) an expression cassette encoding the reverse transactivator protein (rtTA) M2 under the control of the human desmine promoter. The two cassettes are cloned in the same direction (forward orientation)(Chenuaud *et al.*, 2004b). Recombinant AAV were manufactured as described elsewhere (Chenuaud *et al.*, 2004b) and purified by cesium chloride density gradients followed by extensive dialysis against phosphate-buffered saline (PBS).

Animals. Experiments were conducted on 3–5 kg male captive-bred cynomolgus macaques purchased from BioPrim (Baziège, France). The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes (France) approved the protocol. We selected primates that had no detectable neutralizing antibody against AAV serotypes 1 and 8 in the serum. All blood samples were collected under ketamine-induced anesthesia (10mg/kg). Surgical biopsies were performed under ketamine (8mg/kg)/metedomidine (20µg/kg)-induced anesthesia, and marbofloxacin and meloxicam were administered for the following 3–5 days so as to avoid discomfort for the animal.

Vectors administration. IM and RI delivery of rAAV were conducted as described previously (Toromanoff *et al.*, 2008). Eight animals, corresponding to Mac 1 through Mac 8 (described in (Toromanoff *et al.*, 2008), were firstly studied. They received either the rAAV1-LEA29Y vector, either the rAAV8-LEA29Y vector, administered by IM or RI (**Table 1**). In order to prevent an eventual immune response against the human LEA29Y, each macaque was immunosuppressed with 40mg/kg/j of mycophenolate mofetil and 5mg/j of prednisone, both orally administered, during the first 3 weeks after rAAV administration. 9 months (Mac 1 and 2), 4 months (Mac 3, 4, 5, 6, and 8) or 3 months (Mac 7) after the injection of the rAAV-LEA29Y, these 8 macaques received a rAAV-rtTA/Epo vector by IM (**Table 1**). In the last part of the study, seven animals, corresponding to Mac 13 through Mac 16 (described in (Chenuaud *et al.*, 2004b), and to Mac 19 through Mac 21 were studied. They received the rAAV1-rtTA/Epo vector administered either by IM or either by RI (**Table 2**).

Detection of circulating LEA29Y. Serum LEA29Y levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, as recently describe (Toromanoff *et al.*, 2008).

Immunohistochemical analysis. The detection of LEA29Y was carried out in accordance as described recently (Toromanoff *et al.*, 2008).

In situ hybridization procedure. The 480bp WPRE sequence was subcloned in pSPT-18 vector (Roche Applied Science, Meylan, France). Antisense and sense riboprobes were obtained respectively after plasmid linearization with either Hind III or Eco RI (New England Biolab's, Saint Quentin Yvelines, France) and labelled according to the manufacturer's instructions after *in vitro* transcription with either T7 or SP6 polymerase using digoxigenin labelling kit (DIG RNA Labelling Kit, Roche Applied Science, Meylan, France). All steps prior to and during hybridization were conducted under RNase-free conditions. Muscles samples were frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen and 12 µm thick serially sectioned. After drying, sections were post-fixed in 4% PFA, pretreated at 98°C for 10 min in a 1X sodium citrate buffer (Dako, Glostrup, Denmark). Following prehybridization for 60 min at 42°C in a hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 10% (w/v) dextran sulfate, 4X SSC, 1X Denhardt's solution, 10X Blocking solution (Roche Applied Science, Meylan, France) and 425 µg/ml salmon fish DNA, sections were hybridized overnight at 42°C with 1µg/ml of antisense probes diluted in hybridization buffer. Negative controls were conducted by the substitution of sense for anti-sense probes or by the omission of anti-sense probes in the hybridization solution. Then slides were washed with 2X SSC, treated 20 min at 37°C with 5 µg/ml RNaseA in NTE buffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). After stringent wash for 30 min with 50% (v/v) formamide/0.2X SSC at 37°C, sequential washes were performed with 2X SSC (10min X 2 times), buffer 1 (0.1 M Tris, 0.15 NaCl, pH 7.5) containing 5% blocking reagent (Roche Applied Science, Meylan, France) for 30 min and buffer 1 containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100 for 30 min. Following incubation during 2 hours at room temperature with sheep anti-DIG antibody conjugated with alkaline phosphatase (Roche Applied Science, Meylan, France) diluted to 1:1000 in buffer 1, slides were sequentially washed with buffer 1 (5 min X 3 times) and buffer 2 (0.1 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) for 10 min. Alkaline phosphatase substrate (NBT/BCIP, Roche Applied Science, Meylan, France) was then applied for 2 hours. Finally, after washing, slides were counterstained with fast green for 10 sec, dehydrated and mounted.

Anti-AAV IgG-specific antibody detection by ELISA. Circulating IgG antibodies against rAAV capsid were detected using enzyme-linked immunosorbent assay. Plates were coated overnight at 4°C with purified particles of rAAV1 or 8 (10^9 vg/well); blocked 2h at 37°C with PBS containing 0.1% Tween and 1% Gelatin; incubated 2h at 37°C with 6 serial threefold dilutions of thawed macaque sera (a positive control serum known to contain anti-AAV-neutralizing antibodies was assayed); incubated 1h at 37°C with biotin-conjugated anti-human IgG; incubated 1h at 37°C with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, California) at 1 µg/ml. The reaction was developed using 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazolinsulfonate-6 (ABTS, Roche Applied Science, Meylan, France) and absorbance of duplicate samples was read at 405 nm (MRX, Dynatech, Chantilly, Virginia).

In vivo Epo regulation analysis. Doxycycline (Ratiopharm, Ulm, Germany) was given intravenously (20 mg/kg the first day, then 10 mg/kg). The induction protocol started 2 months after rAAV-rtTA/Epo delivery and consisted in 3-days Dox administration repeated once every month, as described in (Stieger *et al.*, 2006). Serum cynomolgus macaque Epo levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine IVD kit, R&D Systems). Detection of anti-rtTA-M2 antibodies was conducted as previously described (Favre *et al.*, 2002) by Western-Blot analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

SRBC immunization: 5 to 10 months after LEA29Y-gene transfer, seven macaques (Mac 1, 2, 3, 4, 6, 7 and 8) were immunized by i.v. with 1.7mL/kg of a 10% solution SRBCs (Eurobio, Les Ulis, France). Two uninjected macaques were also immunized as controls. IgG formation against SRBCs was analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) from serum samples obtained just before immunization and weekly thereafter, by incubating serially diluted heat-inactivated serum with SRBC for 2h, following by incubation with goat FITC-conjugated F(ab')₂ anti-human IgG (γ-chain specific) (Beckman Coulter, Villepinte, France). Results were reported as mean channel fluorescence of serum at each time point / mean channel fluorescence of serum before immunization.

Skin allografts: 5 to 16 months after LEA29Y-gene transfer, Mac 1 through 8, and 6 uninjected macaques, received mismatched (DRB genotyping by DGGE technique, (Knapp *et al.*, 1997) full-thickness and sharply defatted allografts (1.5 x 1.5cm squares) in tandem with autografts (as a technical control) under ketamine/metomidine-induced anesthesia. Skin graft recipients were placed in the prone position. Skin squares were removed from the back of each animal (donor and recipient) and were then transplanted with simple interrupted 4-0 sutures. Sterile gauze with vaseline were placed on top of the grafts and a dressing was applied. The animals were then placed in jackets to protect the grafts. Dressings were changed every 2 days, and sutures were removed on post-transplant day 10.

Anti-LEA29Y antibody detection by ELISA. Circulating antibodies against LEA29Y protein were detected using enzyme-linked immunosorbent assay. Plates (Maxisorp; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with purified recombinant LEA29Y protein (500 ng/well); blocked 2h at 37°C with PBS containing 0.1% Tween and 1% Gelatin; incubated 2h at 37°C with 3 serial dilutions of thawed macaque sera (a positive control serum from macaque immunized with LEA29Y and negative controls with sera before injection were assayed); incubated 1h at 37°C with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Fab specific) (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The reaction was developed using 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazolinsulfonate-6 (Roche Applied Science) and absorbance of duplicate sample was read at 405 nm (MRX; Dynatech, Chantilly, Virginia).

C. Discussion générale des deux articles

Le muscle est un tissu cible attractif pour la thérapie génique puisqu'il est facilement accessible par une simple injection intramusculaire du vecteur, geste non invasif pour l'individu. Des essais cliniques de phase I ou II chez des patients atteints de maladies métaboliques génétiques comme l'hémophilie B (Kay *et al.*, 2000; Manno *et al.*, 2003), le déficit en α 1-antitrypsine (Brantly *et al.*, 2006) et le déficit en LPL (Gaudet *et al.*, 2008; Mingozzi *et al.*, 2008) ont choisi cette voie IM pour administrer le vecteur AAVr2 (FIX, AAT) ou AAVr1 (AAT, LPL). Le muscle est dans ce cas-là utilisé comme site ectopique pour faire exprimer la protéine thérapeutique.

Une quantité maximale d'AAVr à injecter par site IM a été déterminée pour des raisons de sécurité et d'efficacité du transfert de gène, à cause de 1) la faible diffusion de l'AAVr2 après une IM (Arruda *et al.*, 2005), 2) la capacité limitée des myocytes à réaliser les modifications post-traductionnelles, particulièrement dans le cas de fortes MOI (Arruda *et al.*, 2001b; Lasne *et al.*, 2004), 3) la saturation des récepteurs permettant l'entrée de l'AAVr dans les cellules cibles (Summerford and Samulski, 1998). Cette limitation de la quantité d'AAVr à injecter par site est telle qu'il faudrait avoir recours à de multiples injections IM pour un seul patient afin de lui injecter la dose nécessaire, ce qui est problématique principalement pour le confort du patient. De plus, cette voie d'injection n'est pas applicable pour traiter des maladies neuromusculaires telles que les dystrophies musculaires, maladies pour lesquelles tous les muscles doivent être transduits. Dans notre étude, nous avons validé la technique d'infusion de membre isolée (RI) sous pression et sans drogue chez le macaque, modèle préclinique pertinent, et nous avons analysé le profil de transduction et les effets secondaires observés après une telle injection d'un vecteur AAV, en comparaison avec une injection par voie IM.

Aujourd'hui, plusieurs études ont soulevé des problèmes suite au transfert de gène à l'aide d'AAVr. Il a été observé une induction potentielle de tumeurs hépatiques après transfert au moyen d'AAVr chez la souris (Donsante *et al.*, 2007; Donsante *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2003b; Nakai *et al.*, 2005b; Russell, 2007), des réponses immunitaires dirigées contre le produit du transgène (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a) ou la capsid AAVr (Manno *et al.*, 2006; Mingozzi and High, 2007; Wang *et al.*, 2007a). Il était donc pertinent d'étudier également de manière approfondie le devenir des particules virales injectées à court et long terme, au niveau du tissu cible ainsi que dans les organes à distance.

1. Mise au point de l'administration RI d'un AAVr chez le macaque

L'administration par RI, sous pression, en coupant la circulation sanguine du membre postérieur entier par un garrot positionné sous la hanche pendant environ 30 min, est très bien tolérée par le macaque. Physiquement, les animaux n'ont présenté aucune gêne pour se déplacer et leur comportement n'a pas été altéré les jours qui ont suivi l'administration du vecteur. De même aucune anomalie n'a été rapportée à l'examen clinique général des animaux.

Nos observations confirment ce qui avait été observé après une administration d'AAVr1-LacZ par cette voie chez le rongeur et le chien (Su *et al.*, 2005).

Des biopsies musculaires ont été réalisées à 5 (figure 22A et B) et 8 jours post-RI chez un animal témoin qui a reçu uniquement du Ringer-Lactate afin de rechercher des éventuelles lésions au niveau de l'architecture des muscles du membre infusé. Aucune lésion n'a été observée (pas d'œdème, ni de distension ou déchirure de fibre). Une biopsie du muscle vaste latéral de Mac 3 (animal ayant reçu le vecteur AAVr1-LEA29Y par RI) a également été réalisée 8 jours post-RI. Comme chez l'animal témoin, aucune lésion n'a été détectée (figure 22C).

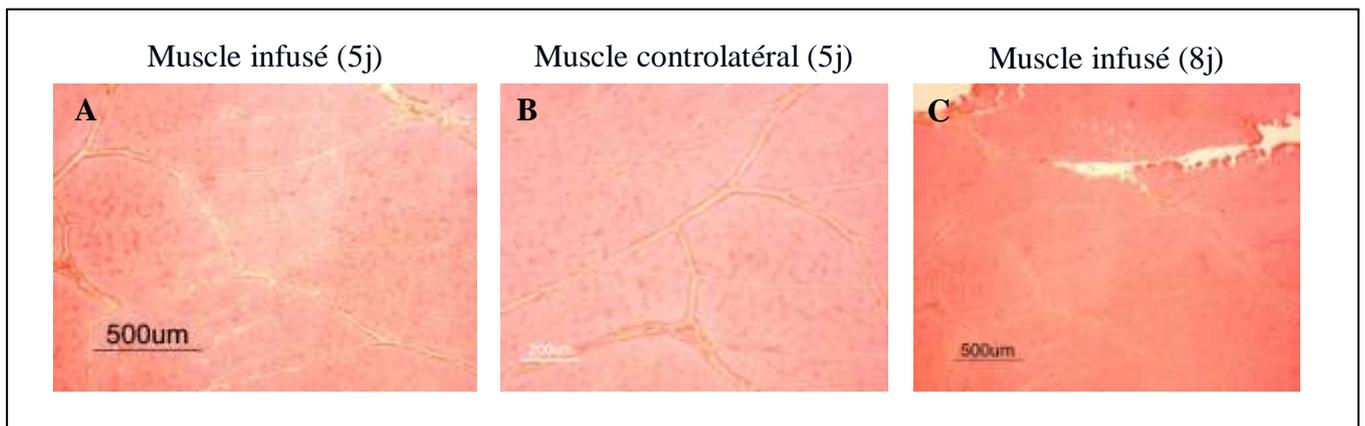


Figure 22 : Histologie d'un muscle 5 ou 8 jours post-RI

Coloration Hémalin-Eosine-Safran.

A. Biopsie du muscle vaste latéral d'un macaque ayant reçu du Ringer-lactate par voie RI 5 jour auparavant.

B. Biopsie du muscle vaste latéral controlatéral du même animal.

C. Biopsie du muscle vaste latéral de Mac 3 ayant reçu l'AAV1-LEA29Y par voie RI 10 jours auparavant.

Après arrêt du flux artériel d'un membre, l'absence d'oxygénation des tissus entraîne rapidement une souffrance cellulaire avec un métabolisme en anaérobiose, réversible. Les muscles squelettiques résistent environ 6 heures à l'ischémie. Les cellules musculaires produisent de l'acide lactique et relarguent des produits de lyse, dont les ions K⁺, les CPK (créatine phosphokinase) et la myoglobine, témoins d'une souffrance musculaire. Tant que le flux artériel n'est pas rétabli, on observe une faible diffusion de ces métabolites dans l'organisme. En revanche, la reperfusion d'une extrémité ischémique est une phase extrêmement critique qui menace non seulement le membre ischémié, mais aussi le reste de l'organisme. La libération de potassium en excès dans la circulation peut entraîner de graves troubles de la fonction cardiaque et la myoglobine libérée peut être responsable d'insuffisance rénale aiguë (Mills and Porter, 1991).

La technique d'infusion de membre isolé (RI) nécessite une ischémie du membre postérieur de seulement 20 à 45 minutes. Les paramètres sanguins suivis (ionogramme, CPK, urée, créatinine, PAL, ALAT, γ GT, bilirubine, numération-formule complète) se sont maintenus dans la norme les heures et jours suivant l'injection. Cette voie d'administration est donc dépourvue de toxicité, que ce soit musculaire, rénale ou hépatique. Le suivi des paramètres sanguins CPK et potassium, éléments responsables de graves troubles après reperfusion d'un membre ischémique, est représenté figure 23. La voie RI, comme la voie IM, n'induit pas d'augmentation des CPK ou de la kaliémie dans les jours suivant l'administration du vecteur. Nos résultats sont concordants avec l'étude de Song *et al.* qui n'avait rapporté aucune augmentation des CPK 2 semaines après une IM d'AAVr1 chez le babouin (Song *et al.*, 2002). L'infusion de membre isolé n'entraîne donc pas de lésions musculaires délétères chez le macaque.

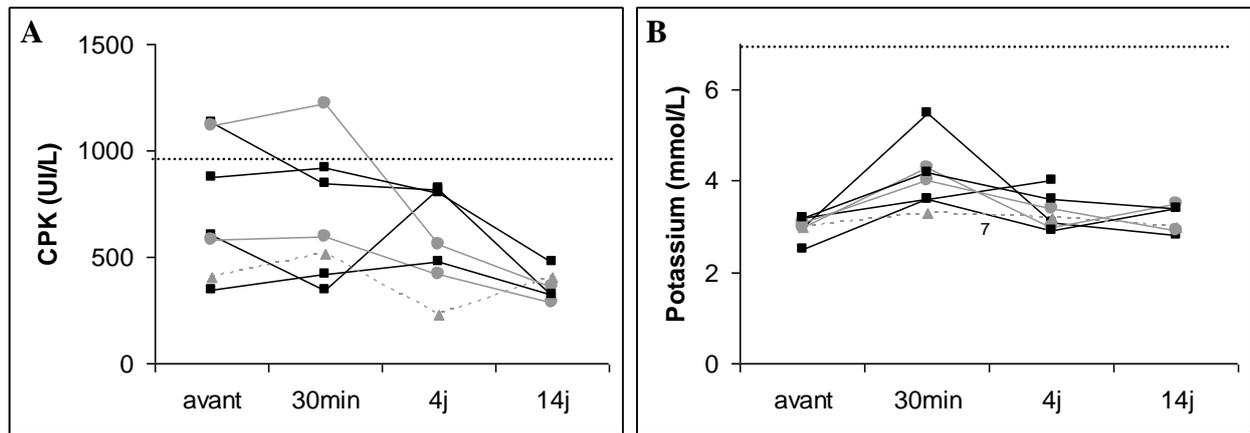


Figure 23 : CPK et kaliémie en fonction du mode d'administration de l'AAVr

Suivi des paramètres sanguins CPK (A) et potassium (B) chez les animaux ayant reçu le vecteur AAVr-LEA29Y soit par IM, soit par RI. Chaque courbe représente un animal. Rond gris : groupe IM (Mac 5 et 6), carré noir : groupe RI (Mac 3, 4, 7 et 8), triangle pointillé gris : macaque ayant reçu du PBS par RI. Dosages réalisés dans le sérum prélevé avant injection, 30 min, 4 jours et 14 jours post-injection. La ligne de référence (en pointillé) est la limite supérieure de la valeur normale du paramètre sanguin (moyenne + 2 écart-type, d'après Schuurman and Smith, 2005).

2. Profils de transduction obtenus

a. Expression du transgène

Tous les macaques ont reçu la même dose de vecteur AAVr-LEA29Y (rapportée au poids de l'animal). Afin de s'en assurer, chaque lot d'AAVr1 et d'AAVr8 a été titré 3 fois par dot-blot, et une fois par Q-PCR, dans deux laboratoires différents.

L'expression du transgène LEA29Y a été dosée dans le sérum par ELISA toutes les semaines les 2 premiers mois suivant l'injection, puis toutes les 2 ou 3 semaines ensuite, jusqu'au sacrifice des animaux.

Le profil d'expression du transgène est le même quel que soit le sérotype ou la voie utilisés : augmentation du LEA29Y sérique au cours des 3 premiers mois post-injection, suivie d'une diminution lente puis d'une stabilisation de l'expression entre 6 à 12 mois post-injection. Ces profils sont en effet classiquement observés après transfert de gène dans le muscle de primate au moyen d'un AAVr, que ce soit avec un promoteur constitutif (CMV et RSV)(Rivera *et al.*, 2005) ou un promoteur muscle spécifique (Desmine) (Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

En revanche, le mode d'administration influe sur le taux d'expression du transgène en fonction du sérotype utilisé. En ce qui concerne le sérotype 1, l'administration du vecteur par voie RI permet d'atteindre une concentration sérique en LEA29Y 5 à 8 fois supérieure par rapport à la voie IM. Avec l'AAVr8, les animaux présentent des taux d'expression du

transgène du même ordre de grandeur quelle que soit la voie d'administration, équivalents à ceux observés dans le groupe RI-AAVr1. Il existe donc un facteur limitant l'expression du transgène lorsque celui-ci est encapsidé dans un sérotype 1 et injecté à l'animal par IM. Une des hypothèses expliquant cette limitation de l'expression est liée à la différence de transduction au niveau du site d'injection IM entre AAVr1 et AAVr8, détaillée dans le paragraphe suivant.

b. Transduction du tissu cible

Après injection par IM, nous avons observé une forte concentration du génome AAVr dans le muscle injecté, que ce soit à 5 semaines post-injection ou au moment de l'euthanasie des animaux (14 à 34 mois post-injection). Jusqu'à 200 copies de transgène par génome diploïde ont été détectées au niveau du site IM, alors que dans les autres muscles du membre injecté, aucune séquence du transgène n'est retrouvée (sauf parfois dans le muscle long péronier : de part sa position anatomique, nous supposons que ce muscle a également reçu le vecteur au moment de l'injection IM). De plus, la voie IM ne permet qu'une faible diffusion du vecteur dans le muscle injecté. Nous retrouvons en effet jusqu'à 10 fois moins de génome AAVr à 1 cm du site d'injection après une IM de 7.10^{12} vg par site. Cette faible diffusion après IM avait déjà été observée avec l'AAVr2-FIX chez des chiens ayant reçu une dose de 2.10^{12} vg en un seul site (Arruda *et al.*, 2005) : huit semaines après injection, une biopsie réalisée au niveau du site d'injection montrait un rayon de diffusion du génome AAVr2 de 0,5 cm environ.

A l'inverse, l'administration d'un vecteur AAVr par infusion de membre isolé (RI) permet la transduction de pratiquement tous les muscles du membre infusé. Même si la répartition de la transduction n'est pas homogène dans tout le membre, cette technique permet d'avoir un nombre de copies du vecteur par cellule plus faible qu'après une injection IM. Comme nous pouvions nous y attendre, la présence du garrot semble avoir limité la transduction des muscles de la partie supérieure de la cuisse infusée.

L'IM est donc associée à une faible diffusion du vecteur, responsable d'un nombre élevé de copies du transgène dans les cellules au site d'injection, alors que la RI permet une transduction plus homogène des muscles d'un membre avec un nombre de copies par cellule plus faible.

Nous n'avons pas pu comparer l'efficacité de transduction après RI entre le modèle primate et chien, puisque dans l'étude de Su *et al.* les auteurs n'ont pas quantifié le nombre de copies de vecteur retrouvées dans les différents muscles infusés (Su *et al.*, 2005), et notre

étude contrairement à la leur, a utilisé un produit du transgène sécrété dans la circulation. Cependant, même avec une dose 20 fois plus faible de vecteur (5.10^{12} vg/kg contre 1.10^{14} vg/kg), pratiquement tous les muscles du membre infusé sont également atteints par l'AAVr chez le macaque : du génome AAVr en quantité significative est détecté dans pratiquement tous les muscles du membre infusé.

En plus de la voie d'administration, le sérotype influe aussi sur le profil de transduction obtenu. L'AAVr1, pour un même mode d'administration et une même dose injectée, induit un nombre de copies du vecteur par cellule 4 à 10 fois plus important que l'AAVr8, avec cependant un même taux d'expression du transgène dans le groupe RI.

Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'AAVr8 est capable de franchir l'endothélium vasculaire plus efficacement que l'AAVr1 (Wang *et al.*, 2005c). Dans des modèles rongeurs de dystrophies musculaires, l'AAVr8 permet en effet de corriger significativement les lésions de tous les muscles musculaires après une unique injection IM ou IV (Nishiyama *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005c; Zhu *et al.*, 2005). Ainsi, après injection IM dans notre étude, le vecteur AAVr8 atteindrait plus facilement les micro-capillaires irriguant les fibres musculaires, lui permettant de transduire les autres fibres musculaires irriguées par ces mêmes capillaires, contrairement à l'AAVr1 qui serait limité à rester au site d'injection. Ceci peut aussi en partie expliquer la grande différence de profil d'expression du LEA29Y observée dans le groupe IM : l'injection de la même dose de vecteur a conduit à une expression 5 à 10 fois plus importante avec l'AAVr8 que l'AAVr1.

Une autre hypothèse pourrait être que les premières étapes de la transduction des cellules sont différentes entre l'AAVr1 et l'AAVr8, ce qui pourrait conduire à des copies du transgène moins actives pour l'AAVr1 que pour l'AAVr8. Dans une étude de Thomas *et al.* sur la transduction de cellules hépatiques à l'aide d'AAVr2, AAVr6 ou AAVr8, les auteurs ont montré que le pic d'expression du transgène FIX chez la souris était plus rapidement atteint avec les pseudotypes 6 et 8 qu'avec l'AAVr2 (Thomas *et al.*, 2004). Dans le foie, le nombre de copies du transgène pour l'AAVr2 et 8 est le même à 3 jours alors qu'il y a 54 fois plus de FIX dans le sang. De même, les auteurs retrouvent 6 fois moins de copies par cellule avec l'AAVr6 que l'AAVr2 alors que l'expression est 5 fois plus forte avec l'AAVr6. Ils ont montré que le génome des AAVr8 retrouvé dans les noyaux était libéré de la capsid AAVr bien plus précocement que l'AAVr2 (sensibilité plus forte à la DNase I). Les auteurs ne retrouvent cependant pas plus de copies d'AAVr8 dans les cellules, ce qui signifie que l'AAVr8 n'est pas internalisé plus efficacement que l'AAVr2. Par contre, une proportion plus

importante de copies est persistante à 6 semaines, contrairement à l'AAVr2 où une grande quantité de génome a disparu. L'AAVr2 est en effet désassemblé relativement lentement (Thomas *et al.*, 2004). De plus, une fois dans le noyau des cellules transduites, les génomes simple-brin s'apparient peu efficacement entre eux et sont rapidement dégradés. L'AAVr8 se désassemble plus rapidement et l'appariement des génomes simple-brins complémentaires est efficace : peu de copies sont dégradées, les formes d'ADN double-brin étant plus stables (Akache *et al.*, 2007). Les travaux de Nakai *et al.* ont également montré que seules certaines formes double brin du génome AAVr2 sont biologiquement actives (Nakai *et al.*, 2001). Ceci pourrait s'appliquer à notre modèle, bien que nous n'ayons observé aucune différence entre le statut moléculaire extrachromosomique des génomes AAVr1 et AAVr8 dans le muscle injecté des animaux plusieurs mois post-injection.

c. Fuite du vecteur dans la circulation

Nous avons quantifié la présence de particules infectieuses (pi) dans le sérum des animaux dans les heures et jours suivant l'administration du vecteur AAVr-LEA29Y (tableau 4) par la technique du RCA (pour *replication center assay*) (Favre *et al.*, 2001). Ce test est basé sur la détection des virus AAVr contenus dans les échantillons analysés se répliquant dans les cellules HeLaRC32, cellules exprimant stablement la protéine Rep en présence d'adénovirus sauvage (Ad5) ce qui permet la répllication d'un vecteur AAVr (Salvetti *et al.*, 1998).

Des particules infectieuses AAVr ont été détectées dans le sérum des 8 animaux de l'étude pendant au plus 7 jours post-administration. Ni le mode d'administration, ni le sérotype injecté ne semble influencer sur la quantité de particules infectieuses circulant au pic (différence non significative) (tableau 4).

		Particules infectieuses circulantes		Particules infectieuses au pic (% de la dose injectée)	Disparition des pi (jours)	
		Pic (h)	Titre (pi/ml)			
AAV2/1	IM	Mac 1	6	6.1×10^6	2.1	4
		Mac 2	6	1.3×10^7	4.3	4
	RI	Mac 3	0.5	4.2×10^7	14.4	7
		Mac 4	0.5	9.5×10^6	6.5	4
AAV2/8	IM	Mac 5	6	4.0×10^5	4.6	4
		Mac 6	6	8.5×10^5	9.6	7
	RI	Mac 7	0.5	1.4×10^6	16	4
		Mac 8	0.5	7.5×10^5	8.5	4

Tableau 4 : Détection de particules infectieuses dans le sérum par RCA

La sensibilité du RCA (5.10^2 pi/mL) dans le sérum avant injection de chacun des animaux était comparable à celle obtenue lorsque le vecteur était incubé dans du milieu de culture. L'analyse RCA a été réalisée sur les sérums prélevés à 30min, 6h, 1j, 2j, 4j, 7j et 14j après administration d'AAVr-LEA29Y. Le pic correspond au temps pour lequel le maximum de particules infectieuses a été détecté. Le volume de sérum chez un macaque a été estimé à 4% de son poids pour le calcul du pourcentage de particules infectieuses circulant au pic en fonction de la dose totale de vecteur injectée. La disparition des particules infectieuses correspond au premier temps post-injection pour lequel aucune particule infectieuse n'a été détectée par RCA. IM : intramusculaire ; RI : infusion de membre isolé ; pi : particules infectieuses.

Nous avons également recherché le génome AAVr dans le sérum des animaux par PCR. Chez les animaux ayant reçu l'AAVr8 (que ce soit par IM ou RI), on ne détecte du transgène que jusqu'à 7 jours maximum. Ce résultat est concordant avec celui du RCA présenté ci-dessus. En ce qui concerne les animaux ayant reçu l'AAVr1, du génome AAVr a été détecté dans le sérum jusqu'à 2 mois post-injection, bien qu'aucune particule infectieuse ne soit détectable dès la première semaine post-injection. Ces différents profils de clairance semblent être dépendants du sérotype : l'AAVr1 persisterait plus longtemps dans le sérum sous forme de particules résistantes à la DNase. Dans une étude antérieure (Favre *et al.*, 2001) chez des macaques ayant reçu $2,5.10^9$ à 1.10^{10} pi/kg d'AAVr2 par IM, la séquence du transgène est détectée dans le sérum jusqu'à 1 semaine post-injection, renforçant le fait que le sérotype semble influencer sur le délai d'élimination du vecteur dans le sérum. Il faut cependant noter que les sensibilités des PCR de ces 2 études n'étaient pas les mêmes (environ 7.10^3 vg/mL de sérum dans l'étude de Favre *et al.*, contre $3,5.10^2$ vg/mL pour notre PCR).

Une autre étude a également montré une persistance jusqu'à 2-3 mois post-injection du génome AAVr1 dans le sang de souris et de lapin après une injection IM de $1,2.10^{13}$ à 4.10^{14} vg/kg (Flotte *et al.*, 2007). Cependant, les auteurs n'ont pas étudié parallèlement les différents

composants du sang : le génome est détecté dans le sang sans distinction entre PBMC ou sérum. Dans notre étude, les différents échantillons de sérum ont d'abord été traités à la DNase afin d'éliminer tout ADN libre pouvant provenir de cellules sanguines (PBMC principalement) éclatées après centrifugation du sang coagulé. L'ADN éventuellement présent dans le sérum traité à la DNase a ensuite été extrait pour réaliser une PCR spécifique du transgène LEA29Y. Sur ces mêmes échantillons, une PCR ciblant un gène endogène (GAPDH) a également été réalisée. Tous les échantillons ont été négatifs en séquence endogène GAPDH, prouvant que nos sérums n'ont pas été contaminés par du génome issu de cellules sanguines. Les séquences AAVr retrouvées dans le sérum proviendraient donc de particules AAVr intactes (car résistantes à la DNase) présentes dans la circulation sanguine.

La persistance des particules AAVr dans le sérum pourrait aussi être liée à la présence de l'immunosuppresseur LEA29Y chez nos animaux. Vincent-Lacaze *et al.* ont émis l'hypothèse que les particules AAVr2 pouvaient être séquestrées dans des structures « protectrices » (Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Ces structures pourraient être les tubules transverses (tubules T) spécifiques des muscles squelettiques striés et cardiaques. Ces particules intactes seraient ensuite relarguées progressivement au cours du temps dans le muscle injecté. La présence de l'immunosuppresseur LEA29Y pourrait réduire la clairance de ces structures « protectrices » contenant des vecteurs AAV, conduisant à l'augmentation de la persistance des particules dans la circulation.

d. Biodistribution du transgène

La présence de particules infectieuses dans la circulation sanguine des animaux les jours suivant l'administration de l'AAVr suggère que de nombreux organes autres que le tissu cible ont pu être transduits. En effet, du génome du vecteur a été détecté par PCR dans pratiquement tous les organes et tissus des animaux, quel que soit le sérotype ou le mode d'administration. Entre autres, le foie, la rate, les ganglions lymphatiques et les PBMC des animaux étaient positifs en PCR les jours ou mois suivant l'injection ainsi qu'à l'euthanasie (14 à 34 mois post-injection). La transduction d'organes lymphoïdes et de cellules immunitaires du sang, observée chez tous les animaux quelque soit le sérotype ou le mode d'administration utilisé, est un facteur de risque de déclenchement d'une réponse immunitaire contre le produit du transgène par présentation directe des peptides étrangers par les CPA transduites.

Le génome détecté par PCR dans le foie et les ganglions lymphatiques des animaux est transcriptionnellement actif, quel que soit le sérotype ou la voie d'administration de l'AAVr. Cela explique le fait que même après retrait total du muscle injecté par IM, il y ait encore 30 à 50% de produit du transgène sécrétés dans le sang, alors que la demi-vie de la protéine LEA29Y n'est que d'1 à 2 semaines (Vanhove and Soulillou, 2005). L'expression du transgène ne proviendrait donc pas uniquement du muscle injecté.

Une analyse par RT-PCR des PBMC à plusieurs temps post-injection et de la rate à l'euthanasie sont elles négatives. Ces résultats négatifs ne nous permettent pas de conclure : soit l'expression dans ces cellules est en dessous du seuil de sensibilité de notre RT-PCR, soit le transgène n'est pas transcriptionnellement actif dans ces cellules.

La transduction des gonades et du foie étant critique pour une application clinique du transfert de gène à l'aide d'AAVr, elle a été développée plus en détail dans les deux paragraphes suivants.

e. Transduction des gonades

Savoir si le transgène sera transmis à la descendance est important pour l'application du transfert de gène à l'homme.

Nous avons détecté par PCR du génome AAVr chez 7 animaux sur 8 entre 2 et 8 mois post-injection (prélèvement chirurgical d'un testicule), et chez 3 animaux sur 8 entre 14 et 34 mois pi (à l'euthanasie). Le sérotype ou la voie d'administration ne semblent pas influencer sur la présence ou non du transgène dans les testicules. Ces résultats confirment ce qui a déjà été observé récemment par Flotte *et al.* après injection IM d'un AAVr1 chez la souris et le lapin (Flotte *et al.*, 2007) : les gonades des souris injectées sont positives en séquences du transgène. Ainsi, il est possible qu'une injection d'AAVr 1 ou 8 dans le muscle, par voie IM ou RI, puisse transmettre le transgène à la descendance suite à la transduction d'un gamète, comme cela a également été montré avec l'AAVr2, que ce soit chez l'animal ou l'homme, après IM ou IV (Manno *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2002).

La présence du transgène dans les gonades ne signifie pas forcément qu'il y aura transmission à la descendance. En effet, les gonades sont composées d'une multitude de cellules : les cellules germinales contenues dans la fraction mobile, et les cellules somatiques non transmises à la descendance. Pour des raisons techniques, il nous a été impossible de prélever de la semence chez nos 8 macaques. La fraction mobile n'a donc pas pu être analysée

séparément de la fraction non mobile. Schuettrumpf *et al.* (Schuettrumpf *et al.*, 2006) ont démontré dans une étude réalisée chez le lapin qu'une injection de 1.10^{11} à 1.10^{13} vg/kg d'AAVr2-FIX par voie IV présentait de faibles risques de transmission du transgène. Il est probable que, même si le gamète est transduit, la copie du vecteur se perde par dilution au cours des multiples divisions après fécondation. En effet, après transduction par un AAVr, il n'y a que de très rares événements d'intégration : la plupart des génomes AAVr se retrouvent sous forme extrachromosomique (Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Plusieurs études ont d'ailleurs montré qu'il y a une diminution du nombre de copies du transgène au cours du temps, et que la présence de séquences AAVr dans les gonades n'est plus détectable après de nombreux cycles de spermatogénèse (Schuettrumpf *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2002). Cependant, des études plus exhaustives restent à faire afin de connaître plus précisément quel est le risque de transmettre le génome du vecteur suite à une injection d'AAVr chez l'homme.

f. Transduction du foie

A l'heure actuelle, plusieurs études ont observé une toxicité hépatique suite à une administration d'AAVr chez la souris (Donsante *et al.*, 2007) et chez l'homme (Manno *et al.*, 2006). Donsante *et al.* ont observé une incidence élevée de carcinomes hépatiques chez des souris atteintes de mucopolysaccharidose de type VII (MPSVII) ayant reçu en période néonatale un vecteur AAVr2- β Glu en IV. Les auteurs ont mis en évidence dans les cellules des tumeurs hépatiques l'intégration du génome AAVr. Cependant, l'étude portant sur un petit nombre d'animaux ne permet pas de conclure quant à l'effet de l'intégration de l'AAVr dans le foie sur l'apparition de ces tumeurs (Donsante *et al.*, 2007; Donsante *et al.*, 2001). Dans l'essai clinique de thérapie génique de l'hémophilie B, il a été observé une toxicité hépatique suite à l'injection IV d'AAVr2-FIX, conduisant à une hépatite et à la perte d'expression du transgène quelques semaines après injection (Manno *et al.*, 2006). La cause de cette hépatite est le développement d'une réponse immunitaire T CD8⁺ dirigée contre des épitopes de la capsidie d'AAVr2 (Mingozzi *et al.*, 2007b). Suite à ces observations de génotoxicité et immunotoxicité apparente du transfert de gène à l'aide d'AAVr, il est important de s'intéresser à l'éventuelle transduction du foie suite à un transfert de gène à l'aide d'AAVr.

Nous avons quantifié le nombre de copies du vecteur dans le foie à partir de biopsies hépatiques, et de l'organe prélevé au moment de l'euthanasie. Les biopsies ont été réalisées

entre 5 et 27 mois post-injection. Les animaux ont été euthanasiés entre 14 et 34 mois post-injection (tableau 5).

			date biopsie (mois pi)	nbre de copies du transgène par cellule (biopsie)	date euthanasie (mois pi)	nbre copies de du transgène par cellule (euthanasie)
AAV1	IM	Mac 1	27	3,8	34	2,3 ± 0,7
		Mac 2	27	2,1	34	0,9 ± 0,2
	RI	Mac 3	22	2,7	27	3,5 ± 0,7
		Mac 4	10	13,3	14	2,4
AAV8	IM	Mac 5	24	0,7	19	0,3 ± 0,1
		Mac 6	6	2,6	20	1,2 ± 0,3
	RI	Mac 7	5	9,1	20	2,4 ± 1
		Mac 8	13	0,2	19	0,4 ± 0,3

Tableau 5 : Quantification par Q-PCR du nombre de copies du transgène dans le foie

Quantification de nombre de copies du transgène LEA29Y par Q-PCR (avec comme référence interne l'endogène ϵ -globine) dans le foie des 8 primates de l'étude. Les biopsies ont été prélevées entre 5 et 27 mois après transfert de gène. Les euthanasies ont été faites entre 14 et 34 mois pi. Pour la quantification du nombre de copies du transgène dans le foie au jour de l'euthanasie, nous avons réalisé l'extraction ADN de 6 morceaux de foie repartis sur l'ensemble des lobes de l'organe, et réalisé une PCR quantitative sur chacun de ses morceaux. Le tableau indique la moyenne des résultats obtenus dans les 6 échantillons.

Le foie de tous les primates de cette étude a été transduit. Même plus d'1 an post-injection, nous avons retrouvé par Q-PCR des quantités non négligeables de génome AAVr (tableau 5).

Le fait que ces copies du vecteur retrouvées dans le foie de nos 8 animaux soient transcriptionnellement actives (RT-PCR positives) suggère de réaliser une étude plus approfondie sur cet organe, afin de déceler toute éventuelle toxicité de notre vecteur selon le mode d'injection et le sérotype. Tous les foies de nos macaques ont donc été minutieusement observés macroscopiquement et microscopiquement à l'euthanasie. Aucune lésion n'a été observée. Les paramètres biochimiques hépatiques (PAL, ALAT, γ GT, bilirubine) mesurés mensuellement chez ces animaux sont toujours restés dans les normes. Dans notre contexte, aucune hépatotoxicité liée au transfert de gène d'AAVr-LEA29Y n'a été observée de 1 à 3 ans après administration.

Il reste aujourd'hui à déterminer précisément si des événements d'intégration peuvent être détectés dans le foie de nos animaux. Plusieurs transferts de gène ciblant le foie à l'aide d'AAVr ont conduit à l'intégration du génome AAVr dans le foie de différents modèles animaux (Donsante *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 1998; Nakai *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2003b; Nakai *et al.*, 2005b), même si le génome du vecteur se retrouve à plus de 99% sous forme extrachromosomique, forme qui est principalement responsable de la stabilité de transduction du foie (Nakai *et al.*, 2001). L'analyse de nos échantillons de foie par la technique de LAM-PCR pourrait nous permettre de répondre à cette question (Schmidt *et al.*, 2007). La LAM-PCR permet en effet l'amplification et le séquençage de régions inconnues dans n'importe quel génome donné. Le principe général de cette stratégie est le suivant : 1) amplification linéaire avec une amorce biotinylée spécifique du transgène ; 2) les fragments simple brin ainsi formés sont isolés par leur extrémité biotinylée grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine ; 3) ces fragments sont convertis en séquences double-brin à l'aide d'hexanucléotides aléatoires et de fragment de Klenow (activité polymérase) ; 4) les fragments ainsi reconstitués sont digérés par une enzyme de restriction ; 5) les fragments d'ADN ainsi générés sont ligués avec un adaptateur au niveau du fragment cohésif généré ; 6) deux PCR nichées sont effectuées avec des amorces spécifiques du transgène et de la séquence de l'adaptateur ; 6) séquençage des amplicons obtenus.

3. Le LEA29Y seul n'est pas suffisant pour inhiber la réponse anti-transgène

Le taux de LEA29Y chez les 8 macaques de notre étude était compris entre 15 et 100µg/mL selon les animaux. Ces valeurs sont considérées comme immunosuppressives dans la littérature (Larsen *et al.*, 2005), ce que nous avons confirmé chez nos macaques : après immunisation aux globules rouges de moutons (SRBC), les animaux exprimant le LEA29Y n'ont pas produit (ou très faiblement) d'anticorps anti-SRBC les semaines suivant l'immunisation. Le LEA29Y exprimé suite au transfert de gène agit donc chez le macaque cynomolgus sur la réponse humorale T-dépendante comme cela avait été montré par Larsen *et al.* (Larsen *et al.*, 2005). Pour vérifier l'efficacité du LEA29Y sur la réponse cellulaire, les 8 animaux ont reçu des allogreffes de peau. L'incompatibilité entre donneurs et receveurs avait été déterminée par génotypage du HLA-DR des macaques. Nos 8 animaux ont tous rejeté les greffes de peau mais avec un délai légèrement augmenté chez les animaux exprimant le LEA29Y par rapport aux animaux témoins sains, sans que la concentration de LEA29Y

sérique (15 ou 100 µg/mL) n'influe sur ce délai. Dans l'étude de Larsen *et al.*, le LEA29Y seul permettait un allongement important (au moins 5 fois plus long) de la survie de greffes de rein. Les taux de LEA29Y sérique chez les macaques de cette étude étaient compris entre 18 et 32 µg/mL pendant les premières semaines post-greffe. Pour des taux de LEA29Y équivalents ou 3 fois plus élevés, nos animaux ont présenté une augmentation du délai de rejet de la greffe bien inférieure. Cependant, il est démontré qu'un greffon de peau est rejeté fortement alors qu'un rein est mieux toléré, à cause de la différence de quantité de cellules immunocompétentes dans ces deux greffons. Ceci peut expliquer la différence de résultat obtenue entre notre étude et celle de Larsen *et al.* (Larsen *et al.*, 2005). La différence de délai du rejet entre nos macaques ayant reçu le vecteur AAVr-LEA29Y et les macaques sains était tout de même significative ($p=0,03$), ce qui signifie que le LEA29Y a un effet sur la réponse cellulaire de nos macaques.

Ainsi, le LEA29Y sécrété après transfert d'AAVr-LEA29Y est fonctionnel chez nos macaques et permet de limiter une réponse humorale T-dépendante et une réponse cellulaire.

Malgré des doses thérapeutiques de LEA29Y, 5 animaux sur 8 ont perdu l'expression du transgène Epo quelques mois après l'injection IM d'AAVr-Epo/rtTA. Cette perte d'expression a été associée à une réponse immunitaire humorale anti-rtTA ainsi que cellulaire au niveau du site d'injection, comme cela avait déjà été décrit auparavant dans ce modèle de transfert de gène (Favre *et al.*, 2002). Même si chez certains animaux le LEA29Y a permis le maintien de la régulation d'Epo à plus long terme (jusqu'à 7 inductions), il n'a cependant pas été suffisant pour inhiber le développement de la réponse immune contre le transactivateur chimérique rtTA. Le développement de la réponse immune anti-rtTA n'est pas corrélé au taux de LEA29Y circulant. En effet, les animaux exprimant des faibles taux de LEA29Y (Mac 1 et 2) ont développé des anticorps anti-rtTA très tardivement par rapport aux études de Favre *et al.* et Chenuaud *et al.*, alors que certains animaux avec de forts taux de LEA29Y (Mac 5 et 6) ont développé des anticorps entre 1 et 3 mois post-injection comme observé dans le modèle sans immunosuppression. La dose de vecteur AAVr-Epo/rtTA injectée et les valeurs d'Epo au pic d'expression n'influent pas non plus sur le délai d'activation de la réponse immunitaire. Chez les 3 animaux ayant gardé une régulation stable tout au long de l'étude, aucun anticorps anti-rtTA n'a été détecté, et aucun infiltrat inflammatoire n'a été observé sur les biopsies musculaires réalisées au site d'injection IM au moment de l'euthanasie.

Récemment, des protocoles d'immunomodulation (comme le MMF, la cyclosporine A, Anti-CD40L, globuline anti-thymocyte, seuls ou associés) ont prouvé leur efficacité pour

prévenir une réponse anti-transgène, soit après transfert d'ADN nu dans un modèle de souris hémophiles (Miao *et al.*, 2006), soit après transfert de gène à l'aide d'AAVr dans un modèle de chien DMD (Wang *et al.*, 2007c)(pour revue, (Miao, 2007)). La molécule CTLA4-Ig a également permis chez la souris une expression à long terme du transgène après injection IV d'un vecteur rétroviral codant la β -galactosidase. Tant que le CTLA4-Ig était détectable dans le sérum des animaux, aucun anticorps anti- β -galactosidase n'a été détecté, contrairement aux souris témoins non immunosupprimées (Puppi *et al.*, 2004). CTLA4-Ig a également inhibé le développement d'une réponse cellulaire cytotoxique spécifique du produit du transgène après transfert de gène à l'aide d'un vecteur rétroviral codant l'IDUA canine dans un modèle de chat MPSI (Ponder *et al.*, 2006).

Dans notre modèle de transfert de gène à l'aide d'AAVr dont le produit du transgène est immunogène, la molécule LEA29Y n'a pourtant pas été suffisante pour prévenir la formation d'anticorps anti-rtTA et inhiber le développement de la réponse cellulaire cytotoxique responsable de la destruction des fibres transduites, bien qu'il soit plus puissant que le CTLA4-Ig. Le contexte AAV doit être différent de celui d'un vecteur rétroviral. On ne connaît en effet que très mal les mécanismes responsables de l'activation du système immunitaire contre un produit du transgène apporté au moyen d'un AAVr. On pourrait penser que ces mécanismes se rapprochent plus de ceux impliqués suite à la transplantation d'un organe, comme le rein par exemple. Dans des modèles de transplantation rénale, le LEA29Y seul n'est pas suffisant : il permet d'augmenter la survie du greffon, mais n'empêche pas le rejet. Le LEA29Y doit être associé à d'autres immunosuppresseurs pour prévenir à long terme le rejet de greffe (Larsen *et al.*, 2005; Vanhove and Soullillou, 2005; Vincenti *et al.*, 2005).

4. La voie RI est peu immunogène

Si le LEA29Y n'a pas permis de prévenir la réponse anti-rtTA, il semblerait que la voie d'administration RI soit associée à une moindre immunogénicité, quel que soit le sérotype utilisé. En effet, parmi les 4 animaux ayant reçu le premier vecteur AAVr-LEA29Y par IM, tous ont perdu l'expression d'Epo, alors que seul 1 animal sur les 4 ayant reçu le premier vecteur par RI a développé une réponse immunitaire, et de manière très retardée en comparant aux autres animaux. De plus, comme présenté auparavant, la voie RI, même si la répartition des muscles transduits n'est pas homogène dans tout le membre, permet d'avoir un nombre de copies du vecteur par cellule bien plus faible qu'après une injection IM où les fibres situées au site d'injection pouvaient contenir jusqu'à 200 copies par noyau après transfert de gène à

l'aide d'AAVr1. Une faible densité de transgène localement pourrait avoir comme conséquence une plus faible proportion de transduction directe de cellules immunitaires limitant ainsi les risques d'activation du système immunitaire de l'hôte.

Aucune augmentation significative du taux sérique de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF α) ou de protéine-C réactive dans les heures et jours suivant l'injection n'a été observée par rapport aux valeurs avant injection. Si on compare les taux d'IL-6 et de TNF α de nos macaques avec ceux de primates ayant reçu un vecteur adénoviral (Ni *et al.*, 2005) par voie IV, il est clair que l'administration d'un vecteur AAVr par voie RI, comme par IM, induit une réponse innée négligeable. En effet, nous avons pu doser en même temps que nos propres animaux, le taux d'IL-6 et TNF α dans le sérum d'un babouin 6h post-injection par voie IV d'un vecteur Ad5/35 (sérum de babouins donnés par A. Lieber) (Ni *et al.*, 2005). Les résultats montrent que le vecteur adénoviral entraîne une élévation d'IL-6 et de TNF α de 4 et 2,5 fois respectivement comparé à nos animaux chez qui l'administration d'AAVr n'a montré aucune élévation de ces cytokines pro-inflammatoires dans 4 jours suivant l'injection. Ceci confirme que, contrairement à l'adénovirus, les vecteurs dérivés des AAV n'activent que très faiblement la réponse immunitaire innée, qu'ils soient administrés par voie IM ou RI.

De plus, ni infiltrat inflammatoire, ni le CMH-I, ni le MAC du complément n'est détectable sur des biopsies musculaires réalisées 5 semaines post-administration. Ceci suggère que l'administration d'AAVr par voie RI n'active pas le MAC responsable de la lyse cellulaire, et que l'absence de forts taux de CMH-I à la surface des fibres transduites rend ces fibres incapables de présenter directement des antigènes aux cellules du système immunitaire.

Toutes ces observations nous suggéraient que la voie RI devrait être moins immunogène que la voie IM. Pour le vérifier, nous avons donc utilisé cette voie pour administrer un vecteur AAV connu au laboratoire pour déclencher une réponse immune anti-transgène après injection IM : le modèle AAVr1-Epo/rtTA chez le macaque cynomolgus.

L'administration par RI du vecteur AAVr1-Epo/rtTA à des macaques non immunosupprimés a en effet permis une expression à long terme dans notre modèle Epo/rtTA chez le macaque cynomolgus. 100 % des animaux (n=3) présentent aujourd'hui une expression stable du transgène Epo aux cours d'inductions successives à la Dox sur au moins 7 mois. De plus, aucun anticorps anti-rtTA n'est détectable dans le sérum de ces animaux et les biopsies musculaires réalisées dans les muscles infusés (ceux comportant le plus de copies

du vecteur d'après notre étude de biodistribution) ne présentent aucun infiltrat inflammatoire ni de destruction de fibres musculaires. Les macaques sont aujourd'hui à 10 mois post-injection et une 7^{ème} induction à la Dox est actuellement en cours.

Dans une étude antérieure menée au laboratoire, 4 animaux avaient reçu ce même vecteur AAVr1-Epo/rtTA sans aucune immunosuppression et par injection IM (Chenuaud *et al.*, 2004b). Tous les macaques ont produit des anticorps anti-rtTA, détectables par western-blot quelques mois après injection. La présence d'anticorps a été associée chez 3 des 4 macaques à la perte d'expression du transgène Epo au bout de 1 à 3 inductions et à la présence d'infiltrats inflammatoires au niveau du muscle injecté. Le 4^{ème} macaque a lui présenté une expression à long terme d'Epo d'au moins 5 ans (Penaud-Budloo *et al.*, 2008), malgré la présence d'anticorps anti-rtTA dès 4 mois post-injection. Une hypothèse serait que ce macaque n'ait pas développé de réponse cellulaire contre le transactivateur, ce qui a permis aux fibres transduites de ne pas être lysées et de continuer à produire le rtTA, ainsi que la protéine Epo en présence de Dox. La voie RI, seule différence entre nos 3 animaux et les 4 animaux de l'étude antérieure, a donc permis de prévenir la réponse immunitaire dans notre modèle rtTA/Epo, tout du moins de la retarder.

De façon surprenante, les 3 macaques infusés avec 1.10^{11} vg/kg d'AAVr1-Epo/rtTA présentent une expression d'Epo bien plus faible que nos animaux immunosupprimés par LEA29Y. Comparé à Mac 7 ayant reçu la même dose d'AAVr1-Epo/rtTA par IM, la valeur des pics d'Epo des 3 animaux infusés est 25 fois plus faible (de l'ordre de 100 mU/mL). Nous ne retrouvons donc pas ce que nous avons observé après administration d'AAVr1-LEA29Y par IM ou RI au niveau du taux d'expression de LEA29Y chez Mac 1 à 4. Le fait que l'Epo soit sous le contrôle d'un promoteur muscle-spécifique (contrairement au LEA29Y qui était sous contrôle du promoteur ubiquitaire RSV) nous permet d'apporter une explication à cette observation. Après RI, il se pourrait qu'il y ait une quantité plus importante de copies du transgène dans d'autres types cellulaires que les fibres musculaires qu'après une injection IM pour laquelle nous avons démontré une faible diffusion de l'AAVr au site d'injection. L'expression de l'Epo étant limitée aux seules cellules musculaires, les taux d'Epo suite aux inductions sont donc plus faibles.

Cependant, nous pourrions penser que cette différence de valeur d'expression du transgène pourrait être une des raisons du non développement de la réponse immunitaire contre le rtTA. Dans l'étude de Chenuaud *et al.*, 2 macaques ayant reçu $2,5.10^{10}$ vg/kg ont présenté 2 ou 3 pics d'Epo entre 50 et 70 mU/mL avant de perdre l'expression du transgène. 2 autres

macaques de cette étude ont reçu une plus forte dose d'AAVr1 ($6,7 \cdot 10^{11}$ vg/kg) : 1 des animaux n'a montré qu'un seul pic d'Epo de 1200 mU/mL avant de perdre l'expression du transgène, et le second macaque dont l'expression d'Epo est persistante (au moins 5 ans) montre des pics d'Epo de l'ordre de 1400 mU/mL. Nous pouvons donc affirmer que le fait d'avoir une faible expression d'Epo (moins de 100 mU/mL) n'empêche pas le développement d'une réponse immune dans ce modèle. De la même manière, une forte expression d'Epo ne provoque pas systématiquement l'activation du système immunitaire.

Nous pouvons donc conclure que la voie d'administration RI, contrairement à la voie IM, semble ne pas activer le système immunitaire dans notre contexte de transfert de gène à l'aide d'un AAVr1. Actuellement, nous ne connaissons pas les mécanismes responsables de cette non-réponse vis-à-vis de la protéine immunogène rtTA (ignorance, tolérance,... ?). Une étude serait nécessaire pour élucider les mécanismes impliqués dans ce modèle, pour ainsi pouvoir les transposer à d'autres modèles.

Cette technique d'administration de vecteur AAV pourrait donc être transposable à l'homme afin de cibler tous les muscles d'un membre et cela en s'affranchissant d'éventuelles réponses immunitaires, même si cela reste à vérifier dans d'autres modèles de transfert de gène, notamment dans les modèles où le tissu cible est inflammatoire (cas des muscles dystrophiques par exemple).

5. Immunotoxicité observée après une injection IM d'AAVr

a. Observation surprenante chez un des macaques de l'étude

De manière surprenante, un des macaques de l'étude (Mac 5) a développé des anticorps dirigés contre la protéine LEA29Y (voir figure S4 du 2^{ème} article). Cette protéine est d'origine humaine. C'est pourquoi les animaux avaient été mis sous traitement immunosuppresseur oral (MMF 40mg/kg/j et prednisone 5mg/j) les 3 premières semaines suivant l'injection afin de prévenir l'immunisation contre cette protéine le temps qu'elle soit en quantité suffisante pour être efficace. Une étude avait déjà décrit la possibilité d'immunisation contre la molécule LEA29Y chez le macaque cynomolgus lorsqu'elle n'est présente qu'en faible quantité (Vanhove and Soullillou, 2005).

Malgré de forts taux sériques de LEA29Y au moment de l'arrêt de l'immunosuppression orale, une production d'anticorps anti-LEA29Y dès 5 semaines post-injection a été mise en évidence chez Mac 5 par ELISA. La présence d'anticorps anti-LEA29Y dans le sérum a été

corrélée à la baisse progressive de l'expression du LEA29Y dès 8 semaines post-injection. Puis à partir de 5 mois post-injection, l'expression du transgène est remontée spontanément de façon inexplicable tandis que le taux d'anti-LEA29Y a diminué. La réponse humorale développée contre la protéine LEA29Y humaine a donc été transitoire. Le taux de LEA29Y sérique étant remonté aux mêmes valeurs que chez Mac 6 ayant reçu le même transfert de gène, on peut supposer que cette réponse n'a pas été associée à la destruction des cellules transduites. Cette observation n'a pas pu être expliquée à ce jour. Une des hypothèses serait que le LEA29Y ne soit pas totalement fonctionnel chez cet animal. Pourtant, même si l'épreuve d'immunisation aux globules rouges de mouton n'a pas pu être réalisée chez cet animal, un léger délai du rejet d'allogreffe de peau (13 jours contre 9 jours pour les témoins) semble tout de même suggérer un effet immunosuppresseur de la molécule LEA29Y chez Mac 5.

Des phénomènes d'immunisation ont déjà été observés après transfert de gène au moyen d'AAVr sans aucune explication à ce jour : contre le FIX chez des chiens hémophiles (mutation faux-sens) (Herzog *et al.*, 1999), contre l'Epo homologue chez le macaque cynomolgus (Chenuaud *et al.*, 2004a; Gao *et al.*, 2004a). Dans ces derniers cas, il est possible que des taux d'expression élevés de protéines recombinantes à partir d'un site ectopique puissent entraîner une rupture de tolérance. Pour chacune de ces études, le transfert de gène avait été réalisé par voie IM.

b. Développement d'anticorps anti-capside AAVr

3 mois après l'administration du vecteur, tous les animaux du groupe IM ont développé des IgG contre la capsid AAVr (AAV8 ou AAV1 selon le sérotype reçu), alors que dans le sérum des 4 macaques du groupe RI une très faible quantité d'IgG, voire aucun anticorps n'a été détecté par ELISA, quelque soit le sérotype. Ces résultats sont indépendants du taux de LEA29Y circulant. Cette différence de taux d'anticorps anti-capsid entre le groupe IM et RI est également retrouvée pour les anticorps neutralisants. Nous savons par expérience que les taux d'anticorps obtenus chez les animaux du groupe IM sont suffisants pour inhiber totalement l'expression de l'administration d'un second vecteur AAVr de même sérotype, contrairement au groupe RI. L'expression d'Epo chez Mac 8 en est d'ailleurs la preuve, puisque ce macaque a reçu 2 administrations d'AAVr de sérotype 8 à 4 mois d'intervalle.

Des études ont montré que la présence de CTLA4-Ig au moment de l'injection d'AAVr permettait une seconde administration du même sérotype chez la souris. Cependant dans notre étude, la concentration en LEA29Y au moment de l'administration du vecteur AAVr est nulle, et elle n'est probablement pas suffisante avant la première semaine post-injection. De même, le traitement immunosuppresseur à base de MMF et corticoïde n'a pas permis de prévenir la formation d'anticorps anti-capside. Mais il a déjà été montré que de telles drogues n'étaient pas toujours suffisantes pour inhiber cette réponse anti-capside (Lorain *et al.*, 2008).

c. Présence d'infiltrats inflammatoires

Sur les biopsies musculaires prélevées 5 semaines post-injection au niveau du site d'injection pour les animaux du groupe IM, quelques amas de cellules présentent une forte accumulation d'ARNm après hybridation *in situ* avec une sonde anti-sens WPRE. De plus un gradient de transduction est également observé : la quantité d'ARNm dans les cellules diminue lorsque l'on s'éloigne du site d'injection. Ces cellules exprimant fortement le transgène sont aussi fortement positives après marquage anti-CTLA4 par immunohistochimie, démontrant qu'un grand nombre de copies AAVr sont actives et aboutissent à la production de la protéine. Des infiltrats inflammatoires ont été observés au niveau du site d'injection IM, localisés ou non autour des fibres exprimant le LEA29Y, quel que soit le sérotype utilisé. Ces infiltrats sont principalement composés de LT CD8⁺, et sont également observés sur des biopsies musculaires réalisées plusieurs mois (entre 11 et 22) après l'injection de l'AAVr. Les fibres exprimant fortement le LEA29Y présentent également un fort taux de molécules CMH-I à leur surface, et le complexe d'attaque membranaire (MAC pour *membrane attack complex*) du complément (fragments C5b à C9) est également détecté au niveau de la membrane de ces cellules musculaires fortement transduites.

A l'inverse, sur les biopsies musculaires des animaux ayant reçu l'AAVr par RI, prélevées 5 semaines ou plusieurs mois après l'injection, aucun infiltrat n'est observé, même pour les muscles présentant un nombre important de copies LEA29Y et positifs après marquage anti-CTLA4 et hybridation *in situ*. Aucune molécule de CMH-I, ni le MAC ne sont présents au niveau de la membrane de ces fibres musculaires transduites.

Ces observations suggèrent que seule la voie IM déclenche une réponse immunitaire locale située au niveau du site d'injection.

La présence de LT CD8⁺ au niveau du site d'injection musculaire et le fort taux de CMH-I à la surface des fibres transduites suggèrent une présentation de peptides étrangers par les fibres musculaires elles-mêmes.

Les fibres musculaires sont capables de présenter, par voie directe, des antigènes de source endogène sur des molécules du CMH-I, ce qui active la réponse immunitaire cytotoxique (LT CD8⁺). Les seuls antigènes endogènes présents au site d'injection sont ceux issus du produit du transgène LEA29Y, puisque aucune séquence virale (capside ou autre) n'est codée par l'AAVr. Cependant, de tels infiltrats inflammatoires sont également observés au site d'injection IM plusieurs mois post-injection (11 à 22 mois). Il est donc peu probable que le produit du transgène soit l'antigène déclencheur de cette réponse immune aussi longtemps après injection. Si c'était le cas, on s'attendrait plutôt à une perte rapide d'expression du transgène après destruction des cellules transduites sécrétant la protéine LEA29Y. De plus, aucune réponse humorale contre le LEA29Y n'a été détectée (sauf pour un animal). C'est pourquoi nous supposons que la capsid AAVr est probablement responsable de l'activation de la réponse immunitaire. Dans le groupe IM, contrairement au groupe RI, tous les animaux ont produit des anticorps anti-capsid les mois suivant l'injection. Ces antigènes sont cependant de source exogène (car non produits par les cellules transduites). Pour pouvoir présenter ces antigènes sur les molécules de CMH-I et activer la réponse cytotoxique, il faudrait que les fibres musculaires soient capables de présenter les peptides de capsid AAVr par cross-présentation. Cette hypothèse a déjà été émise par Herzog pour les hépatocytes. En effet, lors de l'essai clinique de transfert hépatique du gène FIX chez des patients hémophiles, il a été observé une réponse T cytotoxique CD8⁺ dirigée contre les protéines de capsid AAVr2 présentées sur des molécules de CMH-I, suggérant ainsi une possible destruction des cellules hépatiques transduites par cross-présentation des antigènes de capsid par les cellules elles-mêmes (Herzog, 2007).

Pour expliquer la persistance des infiltrats inflammatoires plusieurs mois après l'injection IM, une hypothèse est la suivante : les fortes densités de vecteur au niveau du site d'injection IM, contrairement à la RI, pourraient favoriser la séquestration de particules d'AAVr dans des structures « protectrices », comme évoqué dans le paragraphe 2-c de cette discussion. Ces particules intactes, relarguées progressivement au cours du temps dans le muscle injecté, entretiendraient l'inflammation des mois après administration de l'AAVr. Ce phénomène de séquestration expliquerait également pourquoi il est difficile de reproduire la destruction de cellules transduites par une réponse cytotoxique contre la capsid AAVr sur des cellules en

culture *in vitro* (Li *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2007b; Vandenberghe *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007a).

La présence du MAC à la surface des cellules transduites suggère également que ce sont les capsides AAVr qui sont responsables du déclenchement de la réponse immune. Pour déclencher la cascade d'activation du complément conduisant à la formation du MAC par voie classique, la fixation d'anticorps à la cellule présentant des peptides étrangers est nécessaire (Kemper and Atkinson, 2007). Chez nos animaux, aucun anticorps contre la protéine LEA29Y n'a été détecté dans leur sérum (sauf chez Mac 5). En revanche, dans le groupe IM contrairement au groupe RI, tous les animaux ont produit des anticorps anti-capside. Ces anticorps pourraient donc être responsables de l'activation du complément, conduisant à la lyse des cellules transduites par l'AAVr par le MAC.

d. Pourquoi la voie intramusculaire est-elle immunogène ?

Plusieurs éléments observés dans notre étude suggèrent fortement que la voie IM est associée à l'activation du système immunitaire, quelque soit le sérotype d'AAVr injecté :

- 1) une forte concentration locale du vecteur et donc du nombre de copies du transgène au site d'injection, due à la faible diffusion du vecteur. Ceci a également été observé dans l'étude d'Arruda *et al.* (Arruda *et al.*, 2005). Ceci a pour conséquence directe :
 - une possible augmentation de la capture des peptides (capside) par les CPA locales (Veron *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005a; Wang *et al.*, 2005b; Xin *et al.*, 2006)
 - un risque accru de transduction des CPA locales et des ganglions lymphatiques drainants. Chez nos animaux, comme dans d'autres études (Favre *et al.*, 2001; Flotte *et al.*, 2007; Manno *et al.*, 2006), le génome du vecteur a été détecté dans les PBMC et les ganglions drainants. Nous avons également détecté la présence de transcrits du transgène dans les ganglions drainants. Cependant, cela a aussi été observé dans le groupe RI : ces événements seuls ne sont donc pas suffisants pour activer la réponse immune, même s'ils y participent probablement.
 - une augmentation de la quantité de composants non identifiés du stock viral qui pourraient agir comme adjuvants (Herzog *et al.*, 2002), même si les lots purifiés de vecteurs administrés aux macaques sont propres et très faiblement contaminés en

protéines autres que les 3 VP de la capsid AAVr (vérifié sur gel de polyacrylamide dénaturant coloré au nitrate d'argent – sensibilité du test de 100 ng).

- 2) la forte densité de vecteur au niveau du site d'injection conduit à une concentration accrue localement de produits du transgène due à un nombre élevé de copies du transgène par cellule, particulièrement avec le sérotype 1. Ceci a pour conséquences possibles :
 - l'augmentation du risque de présentation de peptides aux CPA (Sarukhan *et al.*, 2001)
 - des modifications post-traductionnelles anormales du produit du transgène (Arruda *et al.*, 2001b; Lasne *et al.*, 2004).
- 3) une sur-expression des molécules du CMH-I par les fibres musculaires transduites au site d'injection, suggérant une présentation d'antigènes par ces cellules soit par voie directe (produit du transgène), soit par cross-présentation (capsid AAVr).
- 4) la lyse des fibres musculaires présentant les antigènes par le complexe d'attaque membranaire du complément présent en grande quantité à la surface des cellules exprimant fortement la protéine LEA29Y. Ceci suggère la présence d'anticorps pour activer le MAC.

La voie d'injection intramusculaire, quel que soit le sérotype injecté, est toujours associée au développement d'une réponse immunitaire contre le vecteur et/ou le produit du transgène, limitant l'efficacité du transfert de gène.

CONCLUSION

GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Nous avons montré que le système de régulation Tétracycline TetR-KRAB était aussi efficace que le système Tet-On dans un contexte AAVr chez la souris. Il permet une bonne inductibilité de l'expression du transgène en présence de Dox, l'expression du transgène est négligeable en absence d'inducteur, et ce système est réversible. Il reste maintenant à évaluer l'efficacité de cette régulation par TetR-KRAB dans un modèle gros animal tel que le primate. En effet, le système Tet-On avait également montré des résultats très encourageants dans le modèle murin (Bohl *et al.*, 1998). C'est seulement après évaluation de ce système dans le modèle macaque qu'il s'est avéré que la protéine rtTA était reconnue par le système immunitaire (développement d'une réponse humorale et cellulaire), limitant ainsi l'efficacité du transfert de gène à quelques mois (Favre *et al.*, 2002). Ceci souligne l'importance de réaliser des études dans un modèle préclinique tel que le macaque. Il a de nombreuses fois été observé des résultats très différents entre les rongeurs et les grands animaux. Malheureusement, les modèles précliniques ne nous permettent pas toujours de prédire avec certitude ce qui se passera chez l'homme (Manno *et al.*, 2006; Mingozi and High, 2007).

La protéine LEA29Y, dérivée du CTLA4-Ig par mutagenèse dirigée, est un immunosuppresseur empêchant l'activation et la prolifération des lymphocytes T par blocage du signal de costimulation. Elle est capable chez le macaque d'inhiber des réponses cellulaires ou humorales T-dépendantes. Bien que le LEA29Y seul permette un allongement significatif de la survie du greffon dans un modèle de transplantation rénale, il n'a pas été suffisant, même à forte dose, pour prévenir chez tous nos macaques la réponse anti-transgène et anti-capside observée dans notre modèle de transfert de gène AAVr-Epo/rtTA.

Cependant, ce travail de thèse apporte de nouveaux éléments sur les facteurs favorisant l'activation du système immunitaire de l'hôte après transfert de gène dans le muscle squelettique à l'aide d'AAVr.

Il semblerait que la voie d'injection intramusculaire soit toujours associée à des événements immunologiques délétères, aboutissant à la perte d'expression du transgène quelque temps après injection. L'étude approfondie de la dissémination et de la biodistribution des vecteurs AAVr1 ou AAVr8 administrés par voie intramusculaire chez le macaque cynomolgus nous a permis de montrer que l'injection IM induit une forte concentration de copies du transgène dans les cellules au point d'injection, particulièrement avec le sérotype 1, résultant en une forte densité de produit du transgène localement. La forte

densité de vecteurs et de produits du transgène au site d'injection IM est susceptible de favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire dirigée contre la capsid AAVr et/ou le produit du transgène. Cette voie, utilisée dans les essais cliniques actuels, est donc à éviter pour un transfert de gène ciblant le muscle squelettique, ou bien à associer à un traitement immunosuppresseur efficace.

Lors de cette thèse, nous avons mis au point chez le macaque une nouvelle technique d'administration d'un vecteur AAVr avec pour cible le muscle squelettique : l'infusion de membre isolée (RI). Cette voie est très bien tolérée par l'animal, sans entraîner d'effet secondaire délétère. Elle permet la transduction de pratiquement tous les muscles du membre postérieur de l'animal. De plus, des doses de vecteurs AAVr compatibles avec une application clinique ultérieure suffisent pour atteindre une forte expression du transgène. Enfin, cette voie n'est pas associée au développement d'une réponse immunitaire contre le produit du transgène, contrairement à ce qui avait été observé auparavant avec l'injection par voie intramusculaire du même vecteur AAVr (notre modèle immunogène Epo/rtTA). L'infusion de membre isolé est donc une technique efficace pour introduire un gène au moyen d'un vecteur AAV, avec persistance à long terme de l'expression du transgène, au moins dans notre modèle. De plus, cette voie d'administration pourrait être applicable pour le traitement de maladies neuromusculaires, pour lesquelles tous les muscles malades doivent être transduits pour espérer corriger le phénotype.

Une perspective de ce travail est maintenant d'élucider les mécanismes qui font que la voie IM active le système immunitaire. En effet, suite à l'étude comparative de la biodistribution d'un vecteur AAVr après IM ou RI, nous n'avons pas observé de différences significatives. Quelque soit le mode d'administration, nous avons détecté des particules infectieuses dans le sérum jusqu'à 1 semaine post-injection en proportion équivalente et de nombreux organes et tissus autres que les muscles du membre injecté ont été transduits. Les PBMC, ganglions lymphatiques et rate (lieux comportant de nombreuses CPA) sont également transduits chez tous les macaques, avec mise en évidence de l'expression du transgène par RT-PCR dans les ganglions drainants. Les seules différences que nous avons observées se situent au niveau des muscles injectés : des infiltrats inflammatoires principalement composés de cellules T CD8⁺, ainsi que des molécules du CMH-I et du complexe d'attaque membranaire du complément sont détectés sur les biopsies des muscles injectés en IM. Alors que les muscles ayant reçu le même vecteur par RI ne présentent aucune inflammation, et le CMH-I et CAM ne sont pas

déTECTABLES à la surface des fibres transduites, même pour les cellules exprimant fortement le transgène et dans lesquelles on retrouve plus de 30 copies du vecteur par noyau. Il serait donc intéressant de découvrir les mécanismes qui font qu'une injection IM d'un AAVr déclenche une réponse immunitaire, contrairement à la voie RI.

De la même manière, il serait également intéressant d'analyser pourquoi la voie RI n'active pas le système immunitaire dans notre modèle et de confirmer la faible immunogénicité de cette voie d'administration dans d'autres modèles de transfert de gène (promoteur ubiquitaire, produit du transgène sécrété, ...). Des études immunologiques plus précises des mécanismes impliqués suite à une administration d'AAVr par RI nous permettraient de déterminer si cette voie est associée ou non à la génération d'une population T régulatrice, à l'induction d'une tolérance, d'anergie ou d'ignorance des LT face au produit du transgène par exemple.

ARTICLE ANNEXE

Adeno-Associated Virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle

Magalie Penaud-Budloo, Caroline Le Guiner, Ali Nowrouzi, Alice Toromanoff, Yan Chérel, Pierre Chenuaud, Manfred Schmidt, Christof von Kalle, Fabienne Rolling, Philippe Moullier, Richard Snyder. 2008. *Journal of Virology*, **82**(16):7875-85.

Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle[∇]

Magalie Penaud-Budloo,^{1,†} Caroline Le Guiner,^{1,†} Ali Nowrouzi,² Alice Toromanoff,¹ Yan Chérel,³ Pierre Chenuaud,¹ Manfred Schmidt,² Christof von Kalle,² Fabienne Rolling,¹ Philippe Moullier,^{1,4,5} and Richard O. Snyder^{1,5,6*}

INSERM UMR 649, CHU Hôtel Dieu, 44035 Nantes, France¹; National Center for Tumor Diseases Heidelberg, Department of Translational Oncology, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 350, 69120 Heidelberg, Germany²; INRA UMR 703, Ecole Nationale Vétérinaire, 44000 Nantes, France³; Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, 44000 Nantes, France⁴; and Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine,⁵ and Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology,⁶ University of Florida, Gainesville, Florida 32610

Received 23 March 2008/Accepted 21 May 2008

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors are capable of mediating long-term gene expression following administration to skeletal muscle. In rodent muscle, the vector genomes persist in the nucleus in concatemeric episomal forms. Here, we demonstrate with nonhuman primates that rAAV vectors integrate inefficiently into the chromosomes of myocytes and reside predominantly as episomal monomeric and concatemeric circles. The episomal rAAV genomes assimilate into chromatin with a typical nucleosomal pattern. The persistence of the vector genomes and gene expression for years in quiescent tissues suggests that a bona fide chromatin structure is important for episomal maintenance and transgene expression. These findings were obtained from primate muscles transduced with rAAV1 and rAAV8 vectors for up to 22 months after intramuscular delivery of 5×10^{12} viral genomes/kg. Because of this unique context, our data, which provide important insight into in situ vector biology, are highly relevant from a clinical standpoint.

Long-term transgene expression is achieved following recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-mediated gene transfer to skeletal muscle. After conversion of the single-stranded rAAV genome into double-stranded DNA (dsDNA), the vector genome is concatemeric (23, 57, 67) and circularized (12, 20, 21, 35, 57, 64), processes that have been well described in vivo. In rodent skeletal muscle, rAAV vector genomes are maintained mainly as extrachromosomal forms, as demonstrated by a sensitive PCR-based assay (53, 54); thus, gene expression derives predominantly from the episomal forms in this tissue. Similar data were reported for rAAV vector persistence in liver (37, 43), even though the integration rate observed in this tissue is higher (38). The mechanism of how rAAV vector episomes persist and maintain long-term expression of a therapeutic transgene in muscle and other tissues is of great interest to the field.

Numerous episomal viruses are organized in a chromatin-like structure during their life cycle. The circular genomes of papovaviruses, Simian virus 40 (SV40), and polyoma virus exist as minichromosomes composed of cellular histones organized in nucleosomes (1, 2, 13). The structure and assembly of SV40 chromatin have been studied extensively as a model of cellular chromatin (49, 56). The Abutilon mosaic geminivirus, a single-stranded-DNA-containing virus of plants (48) that resembles animal papovaviruses, also assembles into minichromosomes

in situ. Other viruses, such as the duck hepatitis B virus, an avian hepadnavirus (45), and the latent genomes of alpha-herpesviruses, such as herpes simplex virus type 1, and of gamma-herpesviruses, such as Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, are maintained as episomal chromatin (14, 34, 55). The parvoviruses AAV and minute virus of mice (MVM) have been observed to assimilate with histones within hours after infection of cells in culture (3, 36). However, conflicting reports for wild-type AAV (5) and MVM (15) exist for the actual nucleoprotein compositions of these genomes in vitro.

For recombinant AAV vectors, transgene expression in cell lines harboring a single copy of an rAAV-*lacZ* vector stably integrated into the cellular genome can be inactivated over time, but the expression can be rescued in vitro by treatment of the cells with trichostatin, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor (9, 10). In parallel, Okada et al. were able to enhance rAAV transduction when tumor cell lines were treated in vitro with an HDAC inhibitor at the time of vector infection (46). HDAC inhibitors, such as butyric acid, trichostatin, sodium phenylbutyrate, and valproic acid, modify the acetylation of histones, resulting in chromatin rearrangements that allow gene expression (39). Nevertheless, the direct demonstration of rAAV genomes associated with histones has not been shown in vivo.

In this report, we characterize the rAAV vector genome structure in nonhuman primate (NHP) skeletal muscle when the vector copy number has reached a steady state, i.e., several months following gene transfer. The vector genomes persist as episomal monomeric and concatemeric circles in a structure consistent with that of chromatin. Administration of sodium

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Genetics and Microbiology, 1600 SW Archer Road, Gainesville, FL 32610-0266. Phone: (386) 418-1642. Fax: (352) 392-4290. E-mail: rsnyder@cerhb.ufl.edu.

† These authors contributed equally.

∇ Published ahead of print on 4 June 2008.

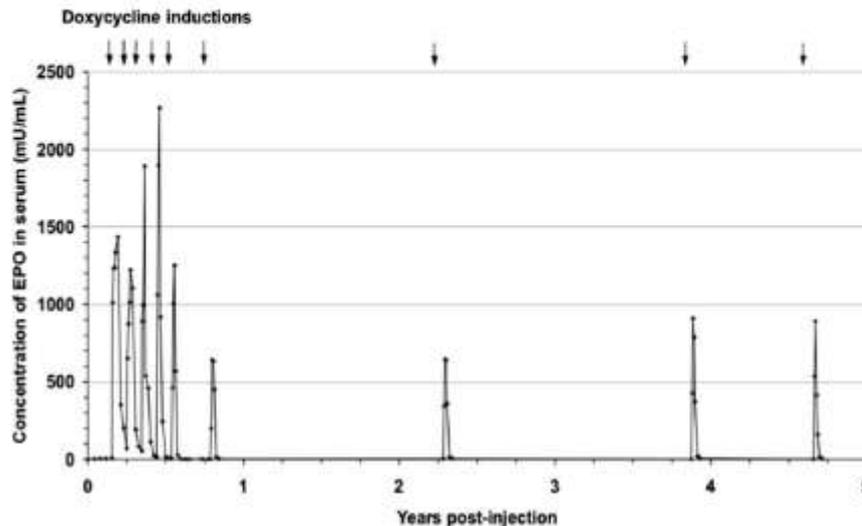


FIG. 1. Long-term expression of a transgene after intramuscular administration of recombinant AAV. An NHP transduced intramuscularly with an AAV1-cmET-Des-M2 construct expresses cynomolgus macaque EPO under the control of the Tet_{ON} promoter after induction with doxycycline.

phenylbutyrate to primates previously transduced intramuscularly with rAAV vectors does not increase transgene expression, indicating that the majority of persistent vector genomes are maintained in a chromatin configuration that accounts for long-term transgene expression. The structure of the rAAV genomes assimilated with histones may begin to explain the long-term persistence of the vector genome episomes and transgene expression in nondividing tissues.

MATERIALS AND METHODS

Production of AAV vectors. The vector plasmid used for rAAV production was generated by cloning the LEA29Y (belatacept) sequence in a pZA backbone harboring the AAV serotype 2 (AAV2) inverted terminal repeats (ITRs) (a gift from J. M. Wilson's laboratory, Philadelphia, PA) between the Rous sarcoma virus (RSV) promoter and a Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE). The LEA29Y sequence was obtained by oligonucleotide-directed mutagenesis, which leads to the substitution of two amino acids in CTLA4-Ig (abatacept) (kindly provided by B. Vanhove, INSERM U643, Nantes, France): L104E and A29Y. rAAV stocks were produced by cotransfection of either pDP1 or pDP8 (respectively, for AAV vector production of serotype 1 or 8) and of the pZA RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector plasmid in 293 cells. rAAV RSV-LEA29Y-WPRE-pA particles were subsequently purified with a CsCl density gradient. The titration of rAAV stocks was typically in the range of 10^{13} viral genomes (vg)/ml.

Intramuscular injection and tibialis anterior muscle ablation of NHPs. Five captive-bred cynomolgus macaques were purchased from the Centre de Recherches Primatologiques, Ferney, France. Anesthesia was performed with ketamine (10 mg/kg of body weight) before intramuscular rAAV delivery. The total volume per injection site was 170 to 300 μ l, and each animal received 5×10^{12} vg/kg of rAAV2/1 (macaques Mac 1, Mac 2, and Mac 9) or rAAV2/8 (Mac 5 and Mac 6) RSV-LEA29Y-WPRE-pA distributed at three injection sites in a tibialis anterior muscle (or at six injection sites in the two tibialis anterior muscles for Mac 9). The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Nantes. The integrity of injected tibialis anterior muscles was taken off at 10 to 22 months postinjection under isoflurane anesthesia. Muscles were immediately transferred in cold phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.5) and preserved for a maximum of 24 h at +4°C for chromatin studies.

Separately from the five individuals used in the present study, Mac 13, whose results are presented in Fig. 1, was described previously and was followed for up to 5 years after that study (11). Briefly, Mac 13 received by intramuscular injection 6.7×10^{11} vg/kg of an AAV2/1 vector encoding the cynomolgus macaque erythropoietin (cmEPO) under the control of the rTA²-M2 doxycy-

cline-regulatable system (61). Doxycycline induction cycles were described in reference 11.

Total DNA extraction from macaque muscle. Total DNA was isolated from the first step of the procedure described below under "Isolation of nuclei from primate muscle." Briefly, tissues were minced finely, the pellet was resuspended in 2 ml of urea buffer (8 M urea, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10 mM EDTA, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) per gram of muscle, and proteinase K was added at a concentration of 2 mg/ml. Samples were incubated for 3 h at 56°C by homogenizing them from time to time. A second run of digestion was realized overnight at 56°C by adding 1 volume of urea buffer and the same quantity of proteinase K. DNA was extracted two times with phenol-chloroform (pH 7.5) and precipitated with sodium acetate and absolute ethanol.

Quantitative PCR. Recombinant AAV genome copy number was quantified in 10 ng of total DNA extracted from NHP-injected muscles using a real-time TaqMan PCR system (LightCycler 2.0; Roche Applied Science). Primers and probes used for amplification of the vector-specific sequence and of the endogenous macaque sequence situated in the e-globin gene, as well as quantitative PCR conditions, are described in reference 60.

Southern blot analysis. Twenty micrograms of total DNA extracted from primate muscles was digested twice for 3 h at 37°C with 2.5 U/ μ g of the restriction enzyme(s) XbaI, EcoRI, or BamHI-ClaI (Roche Applied Science), engendering zero, one, or two cuts, respectively, in the vector. The samples were run on a 0.8% agarose gel (SeaKem LE agarose; Lonza) in Tris-acetate-EDTA (TAE) for 16 h at 35 V at room temperature or on a 0.5% agarose gel prepared with multipurpose QA-agarose (MP Biomedicals) in TAE for 24 h at 35 V and at +4°C. Gels were then stained with ethidium bromide and photographed. After depurination in HCl (0.25 N), DNA was transferred onto a nylon membrane (MP Biomedicals) under denaturing conditions. Southern blotting was performed by using the vector-specific WPRE-pA probe or the RSV probe, which correspond, respectively, to the 867-bp BamHI/ClaI fragment or to the 646-bp BglII fragment of the pZA RSV-LEA29Y-WPRE-pA vector plasmid. The endogenous cmEPO probe corresponds to a 1,226-bp sequence of the macaque EPO gene amplified by PCR with the primers Mac5 (5'-GGTGGAGGTGGG AAGCTAG) and Epo3' (5'-GTGTCAGCAGTGATGGTTCGGAG). Probes were randomly labeled by using the Rediprime II DNA labeling kit (Amersham Biosciences). Twenty-five nanograms of each fragment was labeled by adding 5 μ l of Redivue [α -³²P]dCTP at 6,000 mCi/mol (Amersham Biosciences) and incubating the mixture for 1.5 h at 37°C. The probes were then purified on a Nick column (GE Healthcare), and their specific activities were calculated based on scintillation counting. DNA hybridization conditions were 65°C for 16 h in buffer containing 5 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), 5 \times Denhardt's reagent, 0.5% SDS, and 100 μ g of sonicated herring sperm DNA per ml. Membranes were washed under high-stringency conditions with from 2 \times SSC, 0.1% SDS at room temperature to 0.1 \times SSC, 0.1% SDS at 60°C. The

storage phosphor signal was detected with a Typhoon 9410 Imager (GE Healthcare).

PS digestion. For plasmid-safe DNase (PS-DNase) treatments, 20 μ g of total DNA was digested with XbaI, an enzyme that does not cut in the vector, as described above. DNA was then incubated twice for 16 h at 37°C in 33 mM Tris acetate, pH 7.8, 66 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), and 1 mM ATP with 5 U/ μ g of ATP-dependent PS-DNase (Epicentre Biotechnologies). An ethanol precipitation step was added between the two PS-DNase digestion runs. PS-DNase was inactivated by a 30-min incubation at 70°C. After ethanol precipitation, samples were resuspended in H₂O and loaded onto a 0.8% agarose gel.

Detection of rAAV-cellular genome junctions by LAM-PCR. Linear-amplification-mediated (LAM)-PCR was used to isolate sequences contiguous with AAV genomes in samples of total DNA extracted from macaque muscles (52). The AAV sequence was first amplified from 10 ng of genomic DNA using one of the following biotinylated primers corresponding to the 5' region of the RSV promoter: RSV1bio, 5'-bio-CTCAGCGACCTCCAACACAC, or RSV2bio, 5'-bio-GAGCAGATACTGGCTTAAC. The reaction conditions were as follows: 83.5 fmol of the primer, a 200 μ M concentration of the deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), and 1.25 U *Taq* DNA polymerase with the *Taq* buffer (Qiagen). The cycling conditions were denaturation at 95°C for 2 min followed by 50 cycles of 95°C for 45 s, 57°C for 45 s, and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 5 min. This cycle was repeated after the addition of 1.25 U of fresh *Taq* DNA polymerase for a total of 100 cycles of linear amplification.

The biotinylated PCR products were captured using 200 μ g of streptavidin-coated magnetic beads (Dyna Dynabeads kilobase binder kit) in conjunction with a magnetic particle concentrator (Dyna) according to the manufacturer's protocol. After binding, the beads were washed twice with H₂O and incubated with 2 U of the Klenow fragment (Roche Applied Science), a 250 mM concentration of the dNTPs, and a random-hexanucleotide mix (Roche Applied Science) in a 20- μ l reaction volume for 1 h at 37°C to create dsDNA. Following incubation, the DNA-beads were washed twice as described above and incubated for 1 h at 65°C with 4 U of the restriction endonuclease Tsp509I, which generates a 5' overhang. After restriction enzyme digestion, the beads were washed and a cohesive, double-stranded Tsp509I adaptor (40 pmol) generated by hybridization of two oligonucleotides (LC1, GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCAC AGCAGTTAGG, and LC3, AATTCCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAG ATC) was ligated to the restricted DNA for 5 min at room temperature in a 10- μ l volume containing 2 U of Fast-link DNA ligase, 1 mM ATP, and the accompanying Fast-link buffer (Epicentre). The DNA-beads were washed, and a 1:5 dilution of the eluate was used as the template in a nested PCR. The first round of PCR used 8.35 pmol of each primer, a 200 μ M concentration of the dNTPs, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen), with the corresponding reaction buffer using the same cycling conditions as described above with the exception that only 35 cycles were performed. The adaptor and AAV-specific primers used in the first-round PCR were as follows: LC1 (5'-GACCCGGGAGATCTGAA TTC) and RSV4Bbio (5'-CTGAGAGTGCACCATAACGGATC). The biotinylated PCR products were purified as explained above, and a 1:10 dilution of the eluate was used as the template for the nested PCR with the same reaction conditions as used in the first-round PCR but with the following primers: LCII (5'-GATCTGAAATTCAGTGGCACAG) and ITR1bio (5'-GTCGAGATCTTC CAGAGCATG) or RSV5bio (5'-GATAAGCTGTCAAACATGACG). PCR products were purified with the PCR QIAquick kit (Qiagen) and cloned into the pCR2.1 TOPO-TA cloning vector (Invitrogen). The sequencing of the clones obtained by LAM-PCR was performed by GATC Biotech.

Isolation of nuclei from primate muscle. Nuclei were isolated from freshly excised tibialis anterior muscles of macaques. Muscle was immediately placed in cold 1 \times PBS, pH 7.5, and kept on ice. All manipulations were performed on ice. Muscle was sliced and washed three times with 1 \times PBS, pH 7.5. The connective tissue, the fat, and the nerves were removed. The muscle pieces intended for nucleus isolation or total DNA extraction were distributed randomly. Fragments of muscle were weighed and quickly placed in 15 ml of buffer A (15 mM Tris HCl, pH 7.5, 300 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8, 0.5 mM EGTA, pH 8, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 0.5 mM DTT, protease inhibitor cocktail [EDTA-free Complete; Roche Diagnostics]) for native chromatin preservation. The volumes are given for 1 g of muscle (about 10⁶ nuclei). Muscle was minced using a scalpel and a sharp forceps and homogenized with 10 supplementary ml of buffer A using an Ultra-Turrax T25 homogenizer. After a centrifugation of 10 min at 700 \times g at +4°C, the supernatant of tissue remnants was discarded. The pellet was gently resuspended in 15 ml of buffer B (15 mM Tris HCl, pH 7.5, 300 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, protease inhibitor cocktail) plus 0.5% NP-40 for cytoplasmic membrane lysis. After 5 min of incubation on ice, the samples were filtered

through 16 layers of cheese cloth (17 threads) and centrifuged for 10 min at 700 \times g at +4°C to pellet the nuclei. Nuclei were washed in buffer B and quantified by trypan blue staining.

Micrococcal nuclease digestion assay of myocyte nuclei. An average of 5 \times 10⁵ freshly prepared nuclei were resuspended in 200 μ l of digestion buffer (15 mM Tris HCl, pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.25 mM sucrose, 0.5 mM DTT, protease inhibitor cocktail). A stock solution of 5 U/ μ l micrococcal nuclease (MNase) (Roche Applied Science) was made in 5 mM Tris HCl, pH 7.5, 25 μ M CaCl₂. One MNase digestion condition required two aliquots of 200 μ l of the nucleic suspension. Aliquots were preheated for 2 min at 37°C. MNase was added to nuclei at a range of 0 to 50 U/ml. The nucleus suspension was incubated at 37°C for 1 to 15 min in the presence of 10 mM CaCl₂, and the reaction was stopped by adding 800 μ l of a stop solution (15 mM EDTA, pH 8, 0.625% SDS). The samples were then deproteinized by an overnight incubation at 37°C in the presence of proteinase K (Eurobio) at a final concentration of 40 μ g/ml. The purification of DNA was performed by diluting samples in TNM buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂), followed by sequential phenol (pH 8)-chloroform extraction and isopropanol precipitation in the presence of sodium acetate and glycogen. The DNA pellet was washed with 70% ethanol and resuspended in a Tris-EDTA (10:1) overnight at room temperature. Twenty micrograms of each MNase digestion condition mixture was run on a 1.4% agarose gel containing ethidium bromide for 24 h at 40 V at +4°C in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer. The gel was photographed under UV light. After transfer under denaturing conditions, the membrane was hybridized with a radiolabeled probe specific for the WPRE-pA vector region, stripped with 0.5% SDS, and hybridized with the RSV promoter probe. The same membrane was finally stripped with 0.5% SDS and hybridized with the genomic ³²P-labeled probe cmEPO. The size of the mononucleosome was determined from the following digestion conditions: 20 U/ml for 5 min at 37°C. The average unit length is calculated from the 1-, 2- and 3-mer fragments on each blot after rAAV- or cell-specific hybridization.

Treatment with an HDAC inhibitor. Mac 9 received sodium phenylbutyrate (Ammonaps), an HDAC inhibitor, administered per os for 2 months at a dose of 540 mg/kg/day and then for 1 month at a dose of 1 g/kg/day. Sodium phenylbutyrate was started 5.5 months after vector administration and fractionated in three equivalent doses over the course of a day, with careful intake monitoring. Serum was collected under ketamine-induced anesthesia, and the LEA29Y level was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay described in Toromanoff et al. (60).

RESULTS

Long-term rAAV-mediated protein expression. We previously published 2 year's worth of expression data on NHPs that received an rAAV Tet_{ON} promoter-regulated EPO expression vector intramuscularly (11). In Fig. 1, we show that the AAV1-cmET-Des-M2 vector genome is functionally stable for at least 5 years; these results are similar to those of another study using the rapamycin-inducible system expressed from an AAV vector delivered intramuscularly to NHPs (51). In the present study, we evaluate the structure of rAAV vector genomes at late time points in five primates that were administered a single-stranded rAAV vector of serotype 2/1 (macaques Mac 1, Mac 2, and Mac 9) or serotype 2/8 (Mac 5 and Mac 6) in their tibialis anterior muscles as described in a recent study (60). The vector encodes LEA29Y (belatacept), a mutant form of the human immunosuppressive molecule CTLA4-Ig (abatacept) under the control of the constitutive RSV promoter, followed by the WPRE sequence. The immunosuppressive properties of LEA29Y have been demonstrated in a preclinical primate model of renal allografting (32) and in patients, in whom it prevented rejection after renal transplantation (63). The AAV-RSV-LEA29Y-WPRE-pA-injected animals exhibited the classic expression profile, characterized by an increase in the first 3 months, followed by a slower decrease and a steady state achieved from 6 months on (60).

To evaluate in NHP skeletal muscle the status of the rAAV

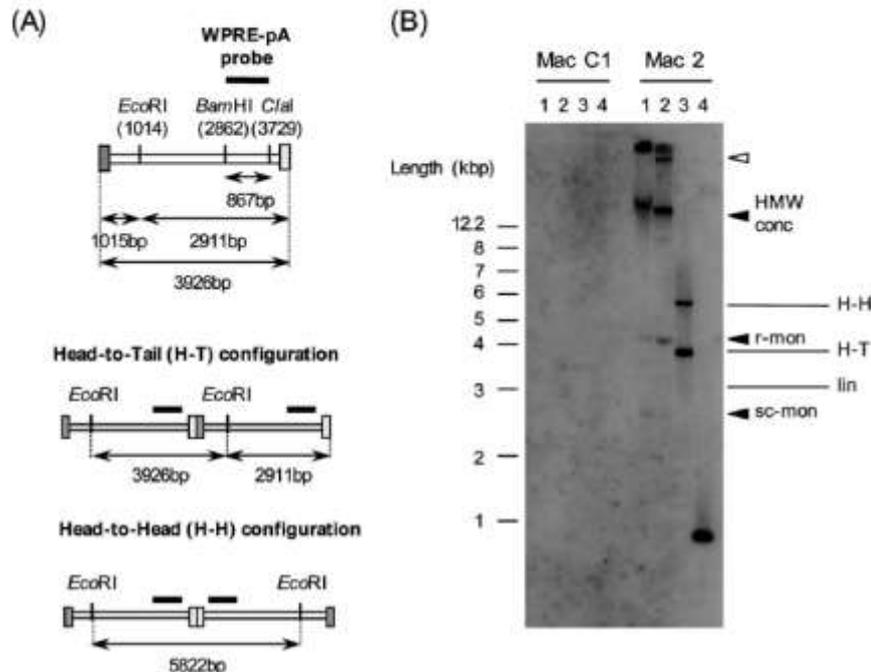


FIG. 2. Persistence of rAAV as monomers and as HMW concatemers in skeletal primate muscle. (A) Schematic diagram indicating the enzyme restriction sites and the position of the rAAV-specific probe (WPRE-pA probe) used for the Southern blotting. (B) Southern blot of total DNA extracted from noninjected (primate Mac C1) and injected (Mac 2) tibialis anterior muscles. Twenty micrograms of total DNA purified from primate skeletal muscle were incubated either in the absence of any restriction enzyme (lane 1) or with *Xba*I (no cut within the vector) (lane 2), *Eco*RI (one cut within the vector) (lane 3), or *Bam*HI-*Cla*I (two cuts in the vector) (lane 4). H-H and H-T indicate, respectively, head-to-head or head-to-tail junctions. The 2,911-bp fragment can be generated after *Eco*RI digestion in the presence of linear (lin) molecules (lane 3). Viral DNA forms are indicated by black arrows. conc, concatemers; sc-mon or r-mon, supercoiled or relaxed monomers, respectively. The HMW-vector-specific signal (open arrowhead) visualized after *Xba*I digestion (lane 2) was identified further as HMW concatemers (Fig. 3).

vector in the steady-state phase, injected muscles were surgically excised 10 to 22 months after injection and total DNA was prepared for analysis. The average number of vector genome copies per diploid cellular genome at the injected site was 34.3 ± 2.5 copies or 8.3 ± 1.5 copies for the NHP that received the AAV1 or the AAV8 vector, respectively (data not shown).

rAAV genomes exist as monomers and HMW concatemers in NHP muscle. In order to assess the molecular status of rAAV, we first performed a Southern blot analysis using several restriction enzymes and a vector-specific probe (WPRE-pA). We determined that the rAAV genomes persist in monomers and high-molecular-weight (HMW) concatemers (Fig. 2, lane 1). Monomers were observed in a relaxed or supercoiled form. Supercoiled monomers were characterized by further experiments described below. When digested with a single cutter (*Eco*RI) (Fig. 2, lane 3), the HMW forms were converted to head-to-head or head-to-tail junction fragments. The 2,911-bp fragment generated from linear molecules corresponds to a very weak signal, suggesting that, several months following transduction, the rAAV genomes are mainly circular. When nondigested DNA (Fig. 2, lane 1) is run on a classical agarose gel, a portion of the vector signal remains trapped in the well by chromosomal DNA. The migration of this signal into the gel is facilitated when the cellular chromosomal DNA is digested with *Xba*I, an enzyme that does not cut in the rAAV genome (Fig. 2, lane 2). Furthermore, the trapping phenomenon is prevented when the DNA is separated on a 0.5% multipurpose agarose gel, which is capable of better separation of

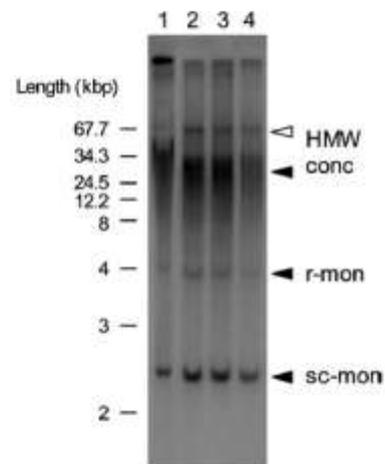


FIG. 3. AAV vector genomes exist as low-molecular-weight and HMW episomes. Twenty micrograms of total DNA extracted from injected primate muscle (Mac 1) were submitted to digestion with several noncutting enzymes: *Xba*I (4 kbp; lane 2), *Avr*II (5 kbp; lane 3), and *Spe*I (8 kbp; lane 4) or were nondigested (lane 1). The average genomic fragment size (kbp) generated by each endonuclease is based on human genome data. Samples were loaded on a multipurpose 0.5% agarose gel intended for HMW DNA separation. After transfer, the membrane was hybridized with the 32 P-labeled rAAV-specific probe (WPRE-pA probe). The open arrow indicates two discrete bands identified as HMW concatemers (HMW conc). sc-mon or r-mon, supercoiled or relaxed monomers, respectively.

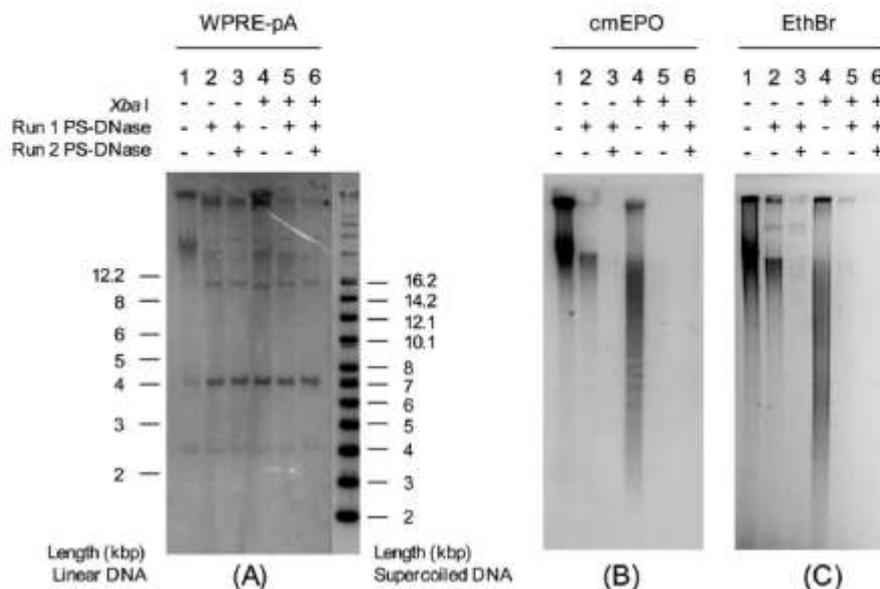


FIG. 4. AAV vector genomes exist as episomal circles. Twenty micrograms of total DNA extracted from injected skeletal muscle (Mac 2) were submitted to digestion with PS-DNase with or without previous digestion with XbaI, which does not cut in the vector. (A) The Southern blot hybridized with an rAAV vector-specific probe is shown. The hydrolysis of rhesus chromosomal DNA by the PS-DNase enzyme was verified by ethidium bromide (EthBr) staining (C) and confirmed after hybridization of the same blot with the cmEPO probe, which is specific for the endogenous cmEPO gene sequence (B).

HMW DNA (Fig. 3). Using several enzymes that cut more or less frequently in the primate genome and do not cut in the rAAV genome, we found that the Southern blot profile remained unchanged, suggesting that the majority of rAAV genomes do not integrate into the host cellular genome (Fig. 3).

rAAV vector genomes exist as episomal circles in NHP muscle. Schnepf et al. (53, 54) performed molecular analysis on rAAV genomes following transduction in murine skeletal muscle and on wild-type AAV genomes in human tissues. Using the PS-DNase and sensitive PCR assays, they convincingly showed that >99.5% of the rAAV genomes assimilate into episomal circular forms in murine skeletal muscle. Here, purified total DNA from four transduced NHPs was treated with PS-DNase, an exonuclease that hydrolyzes all DNA molecules except circular dsDNA. Additionally, genomic DNA was treated with or without XbaI prior to PS-DNase treatment to ensure digestion of cellular DNA. The products were separated on an agarose gel and probed with a vector-specific WPRE-pA probe. As can be seen in Fig. 4, several PS-DNase-resistant vector-specific bands that represent circular supercoiled and relaxed monomers and circular HMW forms are observed. Monomeric and some concatemeric forms remain

even after extensive digestion, i.e., XbaI digestion followed by two 16-hour PS-DNase digestions (Fig. 4A, lane 6), conditions that exceed the time needed to hydrolyze the single-stranded viral DNA, the double-stranded linear DNA (53), and all cellular DNA (Fig. 4C, lane 6). Indeed, when the blot was stripped and probed with a cmEPO probe to detect the endogenous EPO cellular gene, PS-DNase efficiently hydrolyzed the cellular chromosomal DNA, since no EPO signal is detected after two rounds of PS-DNase digestion (Fig. 4B, lane 6). As shown in Fig. 4A, the majority of the rAAV genome signal corresponds to circular monomers as well as some HMW species that are completely resistant to PS-DNase treatment and thus are not associated with the cellular chromosomal DNA. However, we observed that some HMW forms are sensitive to PS-DNase, suggesting (i) the occurrence of concatemer integration in the host genome, (ii) the presence of linear concatemers, or (iii) damage to the HMW episomal molecules during DNA extraction. Nevertheless, linear molecules seem to be a minority, as indicated by the Southern blot data (Fig. 2, lane 3).

To confirm that the majority of the vector genomes are episomal and not integrated into cellular chromosomes, we

TABLE 1. Sequenced LAM-PCR amplicons from NHP skeletal muscle^a

Macaque	rAAV serotype	Time postinjection (mo)	No. of rAAV LAM amplicons	No. of rAAV-cellular junctions	Head-to-tail concatemers	Head-to-head concatemers
Mac 1	2/1	22	283	0	+++	+
Mac 2	2/1	21	130	0	+++	+
Mac 9	2/1	1.5	103	0	+++	+
Mac 5	2/8	12	122	0	+++	+
Mac 6	2/8	10	127	0	+++	+

^a DNA sequencing of rAAV amplicons containing AAV ITR sequences showing predominantly (+++) head-to-tail configurations or, rarely (+), head-to-head amplicons.

further analyzed DNA derived from the skeletal muscle of five treated NHPs for the presence of vector-cell genome junctions by LAM-PCR (52). We previously demonstrated the potency of our approach in efficiently detecting and sequencing integrated AAV vector forms on transduced human 293 cells (69). Here, the sequencing of a total of 765 LAM-PCR amplicons from five NHPs failed to detect any vector-cell genome junctions (Table 1). Instead, rAAV LAM amplicons predominantly resembled concatemeric variants in the head-to-tail orientation, showing complex deletions and rearrangements of the ITR sequences and the characteristic multiplicity of vector sequence rearrangements previously described by others (40, 64). In addition, massive parallel pyrosequencing of rAAV LAM amplicons reaching a total of approximately 150,000 sequence reads from five macaques again revealed the presence of dominant concatemeric vector forms present in the skeletal muscle of the examined NHPs (data not shown). Our results obtained with NHPs extend those of Schnepf et al. following the transduction of rodent skeletal muscle (53). In summary, these results demonstrate that rAAV genomes are maintained predominantly as episomal circular forms in NHP skeletal muscle.

Episomal rAAV genomes are in a nucleosomal structure. To correlate the persistence of rAAV *in vivo* and its molecular structure, we wanted to determine if the episomal viral forms were assimilated into chromatin. Nuclei were isolated from freshly excised NHP skeletal muscle that was transduced for 10 to 22 months and treated with MNase. MNase is an endonuclease that hydrolyzes native chromatin in the linker DNA region between the nucleosomal cores to reveal the nucleosomal pattern (2). A titration of MNase was capable of digesting cellular chromatin into a typical nucleosomal ladder, as revealed by ethidium bromide staining (Fig. 5A) and when probed with the endogenous cmEPO probe (Fig. 5C). When the gel was probed with the AAV vector-specific WPRE-pA probe (prior to the cmEPO probe), a nucleosomal ladder was observed in Mac 1, the injected primate, but not in Mac C2, the nontransduced control animal (Fig. 5B). The major persistent rAAV forms in NHP skeletal muscle, i.e., the supercoiled monomeric and HMW concatemeric circles, were found to be susceptible to MNase digestion. However, two particular forms identified as open-circular and linear monomers were less sensitive to MNase before being digested into single nucleosomes (Fig. 5B). At the highest MNase concentration, a distinct nucleosomal pattern was observed, demonstrating that all forms of rAAV are associated with histones on the target sequence. Analysis of additional NHPs revealed that this initial observation was extended to all individuals analyzed, independently of the rAAV vector serotype (rAAV1 or rAAV8), but not in the nontransduced control animals (Fig. 6 and data not shown). Using a vector-specific RSV promoter probe, we demonstrated that the vector promoter region in the rAAV episomes is also associated with histones (Fig. 6C). Analysis of the nucleosomal unit size was done after an intermediate MNase condition treatment where mononucleosomes, dinucleosomes, and trinucleosomes are visualized. It revealed a unit length of 170 ± 10.4 bp for the cellular chromosomal DNA (cmEPO probe) (Fig. 6D) and of 162 ± 8.8 bp after hybridization with the 867-bp, vector-specific WPRE-pA probe (Fig. 6B). Similarly, the RSV probe that corresponds to a 646-bp sequence in the

RSV promoter showed an MNase pattern where nucleosomes were regularly spaced with a unit length of 159 ± 11.3 bp (Fig. 6C). All together, these data reveal that cellular histones are regularly positioned along the rAAV episomes, creating a chromatin-like structure that is similar to the cellular chromosomal DNA nucleosome pattern (EPO probe) (Fig. 5C and 6D).

HDAC inhibitor does not affect transgene expression. Sodium phenylbutyrate is used clinically to treat sickle cell anemia patients by stimulating the expression of fetal hemoglobin, which undergoes programmed inactivation during development (18, 19, 28). As inhibition of HDAC was shown to increase the transgene expression mediated by rAAV *in vitro* (46), we wanted to assess the effect of such a drug on rAAV-mediated expression in NHPs. Mac 9, which received rAAV2/1 RSV-LEA29Y-WPRE-pA, expressed LEA29Y for more than 11 months in the classic pattern; transgene expression increased during the first 3 months, followed by a decrease until it reached a stable level 6 months following rAAV delivery (Fig. 7). We administered sodium phenylbutyrate, an HDAC inhibitor, per os three times a day for 2 months at a medium dose (540 mg/kg/day) and then for 1 month at a higher dose (1 g/kg/day). The two doses were well tolerated by the primate; however, transgene expression remained unchanged after sodium phenylbutyrate treatment (Fig. 7). This result suggests that the episomal rAAV forms that persist in skeletal muscle are associated with cellular histones that are positioned or modified in a manner that allows transgene expression.

DISCUSSION

The present study (Fig. 1) and previous work (51) show the persistence of functional rAAV genomes for several years after one single IM administration in NHPs. Persistence appears to be independent of the immunosuppressive LEA29Y transgene used here since previous long-term studies of NHPs have utilized a constitutively expressed tetracycline regulator, a rapamycin regulator, and EPO (11, 51). Therefore, there must be a mechanism by which episomal and nonreplicating vector genomes associate with nuclear components to achieve stability and functionality in quiescent tissues. In this paper, we provide evidence that in a nondividing cell population such as normal skeletal muscle, rAAV episomal genomes are remarkably stable and persist mainly as supercoiled monomeric and concatemeric circles and, most notably, in a chromatin-like structure.

As determined by pulsed-field gel electrophoresis, fluorescent *in situ* hybridization, isolation of vector-cellular DNA fragments, and *in vivo* selection of hepatocytes, rAAV vectors can integrate *in vivo* in the liver (8, 16, 40–42), although extrachromosomal rAAV genomes represent ~90% of the vector genomes and are primarily responsible for stable liver transduction (43). Hepatectomy-induced liver regeneration shows that in specific experimental settings, rAAV genomes are diluted and do not persist (26), similar to the dilution seen in neonatal mice (66). It seems that no-end, linear, double-stranded rAAV genomes are more easily degraded and lost by hepatocyte division than circular and concatemeric genomes after rAAV administration in mice (30). In contrast, no integration event was detected in murine muscle tissue (53). Indeed, based on the demonstrated sensitivity of the B1-PCR

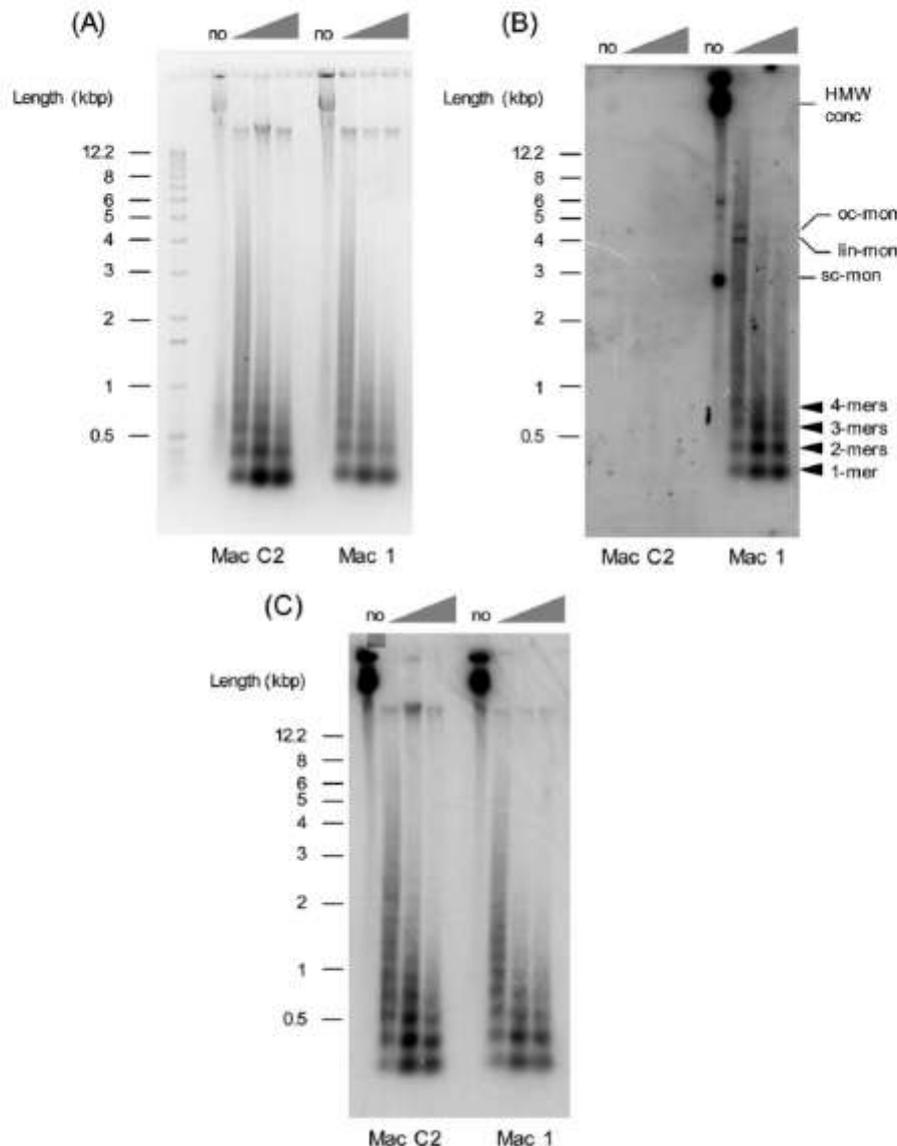


FIG. 5. Episomal rAAV genomes are in a chromatin-like structure. An MNase digestion assay was performed on nuclei isolated from an injected primate muscle (Mac 1) more than a year after rAAV administration of serotype 2/1 AAV RSV-LEA29Y-WPRE-pA particles. Muscle biopsies were performed on a noninjected macaque (Mac C2), which was used as a negative control. Isolated nuclei were treated with increasing concentrations of MNase (0 to 50 U/ml, with "no" indicating no MNase) at 37°C and deproteinized, and DNA fragments were purified. After electrophoresis on a 0.8% TAE-agarose gel, the MNase pattern of the digested native chromatin was checked by ethidium bromide staining (A). Following transfer to the membrane, the vector-specific signal was detected by hybridization with the ^{32}P -labeled WPRE-pA probe (B). The blot was stripped and hybridized with the ^{32}P -labeled cmEPO probe specific for the endogenous cmEPO gene sequence (C). rAAV forms are indicated as HMW concatemers (HMW conc), open-circular monomers (oc-mon), linear monomers (lin-mon), and supercoiled monomers (sc-mon). Black arrows indicate the mono-, di-, tri-, and tetra-nucleosomes visualized after MNase digestion and characteristic of a classical chromatin pattern.

assay complemented by a PS-DNase digestion assay, Schnepf et al. concluded that episomes correspond to more than 99.5% of vector DNA (53). Additional work showed that the majority of the rAAV vector DNA in muscle persisted over time as episomes (21, 57, 64). Moreover, circular rAAV genomes have also been detected in humans who received an rAAV-FIX vector intramuscularly (35). Several studies of muscle suggested that extrachromosomal, circular rAAV dsDNA genomes are likely responsible for long-term transgene expression (20, 53, 68). Altogether, our molecular analysis confirms that circular rAAV episomes drive transgene expression in

primate skeletal muscle. This finding is supported by the fact that LAM-PCR and high-throughput sequencing (data not shown) analysis failed to detect integration events in NHP skeletal muscle. The combinatorial approach of high-throughput LAM-PCR and massive parallel pyrosequencing, which is dispensable for bacterial subcloning steps (29, 40), point to a very low integration frequency of rAAV vectors in NHP skeletal muscle and confirm that the rAAV genomes found to be associated with histones are predominantly present as episomal forms. We cannot exclude the possibility of the presence of rare integrated forms following the transduction of NHP skel-

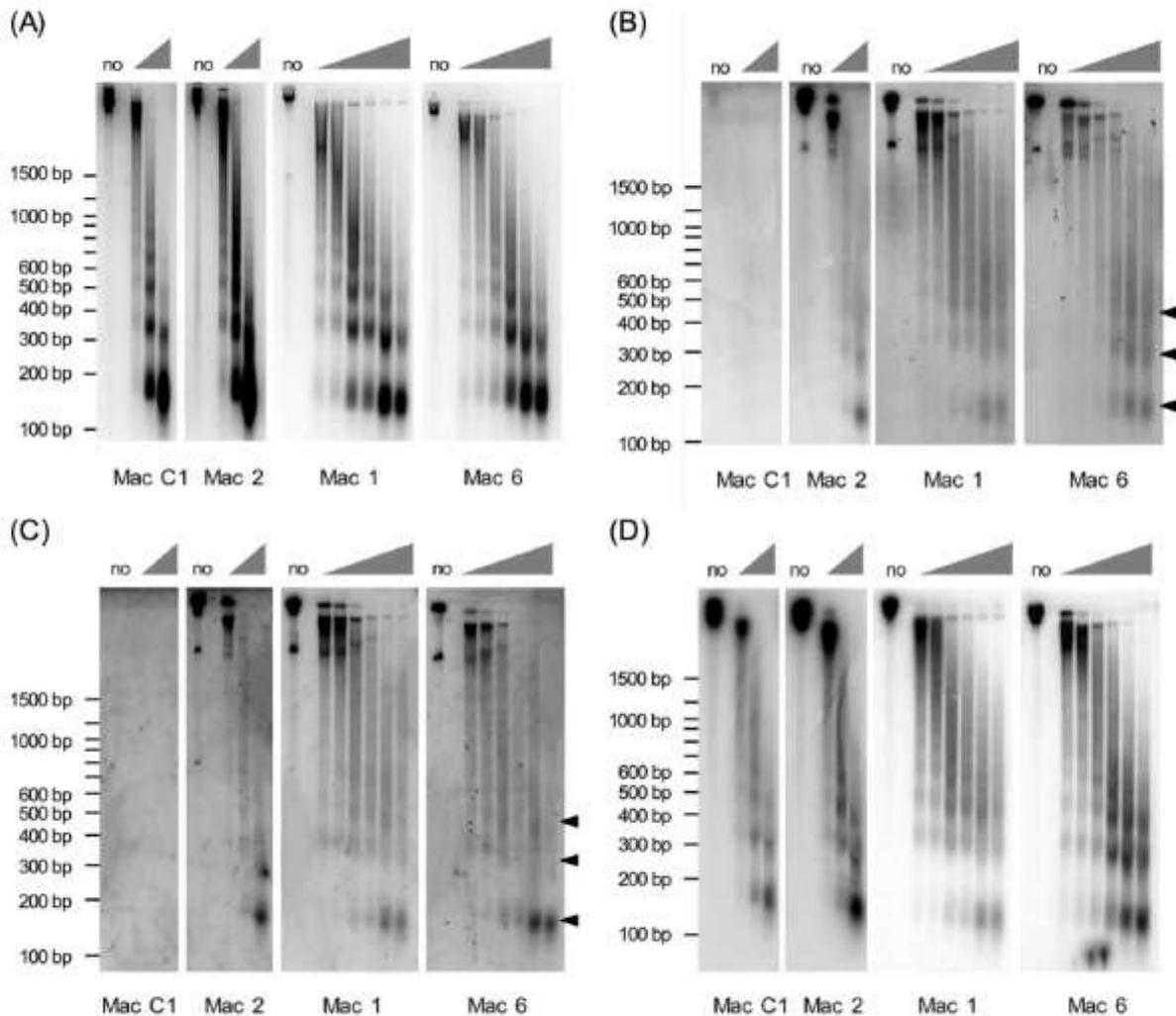


FIG. 6. Different regions of the rAAV vector genomes are in a chromatin-like structure. An MNase digestion assay was performed as described in the legend to Fig. 5. Equivalent doses of serotype 2/1 (Mac 1 and 2) or serotype 2/8 (Mac 6) AAV RSV-LEA29Y-WPRE-pA particles were administered by intramuscular injections. Muscular biopsies were performed on a noninjected macaque (Mac C2), which was used as a negative control. Isolated myocyte nuclei were treated with increasing concentrations of MNase (0 to 50 U/ml, with "no" indicating no MNase) to digest native chromatin, and the chromatin fragments were purified. After electrophoresis on a 1.4% TBE agarose gel, the MNase profile of the digested chromatin was checked by ethidium bromide staining (A). Following transfer to the membrane, the vector-specific signal was detected by hybridization with the ^{32}P -labeled WPRE-pA probe (B). The blot was stripped and hybridized with a vector-specific RSV promoter probe (C). Lastly, the blot was hybridized with the ^{32}P -labeled cmEPO probe specific for the endogenous cmEPO gene sequence (D). Black arrows indicate the mono-, di-, and trinucleosomes visualized after MNase digestion and characteristic of a classical chromatin pattern.

etal muscle, as was seen in mice by Inagaki et al. (29). Nevertheless, our analyses demonstrate that the majority of the rAAV genomes are episomal. Further experiments are needed to give exact estimations of the integration frequency in diverse rAAV-transduced tissues from clinically relevant studies, as well as to carefully consider dose-dependent influences.

The concept of a viral minichromosome was formulated to describe the organization of the circular SV40 genome with cellular histones in the nuclei of infected permissive cells (2, 13, 25). The linear adenovirus genome has been shown to be complexed with the virus-derived histone-like protein VII, which condenses the 36,000-bp adenoviral genome in the virion, but this protein is released from the viral DNA for chromatin assembly a few hours after infection (59). The parvoviruses AAV and MVM were also described as organized in

chromatin structure within hours after infection in cell culture (3, 36), and in the case of wild-type AAV did not require the presence of a helper virus or DNA replication. In all cases, the presence of viral nucleosomes is believed to be an essential step in the life cycle of the wild-type virus, which prompted us to determine whether rAAV genomes are arranged in situ like minichromosomes. As shown here, our MNase digestion assay data indicate that the rAAV vector genome, devoid of sequences coding for viral proteins, is a substrate for chromatinization, with a structure that is similar to the structure of cellular chromatin. This was further confirmed when histones were removed from the episomal rAAV vector genomes during DNA extraction to yield negatively supercoiled circular molecules that were relaxed by *Escherichia coli* topoisomerase I (data not shown). Indeed, removal of histones from DNA

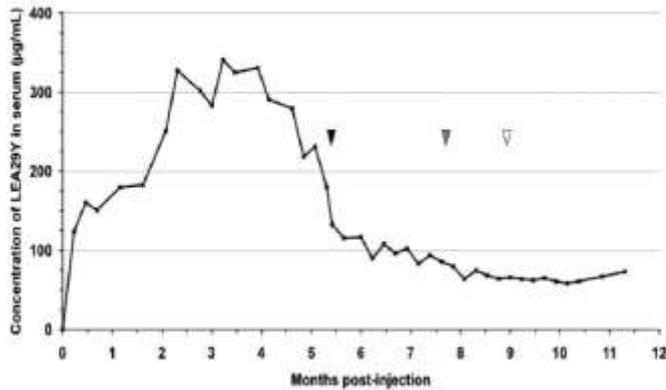


FIG. 7. Transgene expression mediated by rAAV cannot be modulated by an HDAC inhibitor. Mac 9 injected with AAV2/1 RSV-LEA29Y-WPRE-pA was treated by sodium phenylbutyrate at 5.5 months postinjection (black arrowhead) at a dose of 540 mg/kg/day and for 2 months. The treatment was prolonged for one supplementary month at a dose of 1 g/kg/day (gray arrowhead) and stopped (open arrowhead). The serum concentration of LEA29Y was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay.

during extraction produces negative supercoiling (45, 24). DNA supercoiling could also be a mark of transcription activity (31).

The fact that histones are complexed with episomal circular plasmid following naked plasmid injection *in vivo*, which in turn regulates transgene expression via epigenetic modifications (50), suggests that DNA replication and/or viral sequence motifs are not a prerequisite for the generation of rAAV chromatin, at least in quiescent tissues and *in vitro* (6). Furthermore, the generation of circular rAAV genome intermediates is responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue (21). In our study, it appears that circularization and chromatinization of the rAAV genomes may be critical for *in vivo* persistence in a quiescent tissue, mechanisms that are conserved with other viral genomes maintained during latency. However, we do not exclude the possibility that some gene expression may originate from a minority population of linear or naked circular molecules. The unique aspect of episomal rAAV vector chromatin is that it remains in a configuration that allows high-level, long-term gene expression.

As we demonstrated that double-stranded rAAV genomes are a substrate for chromatinization *in vivo*, transgene expression could be regulated by histone epigenetic modifications. In the cell lines stably harboring a single integrated vector, transgene expression can be reactivated following the treatment of cells with HDAC inhibitors (9, 10). These *in vitro* studies do not reflect the status of the rAAV vector DNA *in vivo*. In this report, we did not analyze the status of the rAAV vector genomes at early time points following transduction, so it is unclear when histones associate with rAAV episomes *in vivo*. It has been shown that within a few weeks postinjection in the skeletal muscle and liver, the number of rAAV genomes is dramatically reduced (64, 65). This loss of vector genomes may be due to degradation of virions by the proteasome following rAAV entry into the target cell (17). Alternatively, processing of rAAV genomes has been shown to be dependent upon DNA damage/repair pathways (7, 12). While most vector genomes are lost, a minority are converted to stable, double-

stranded circular and concatemeric forms. It is possible that most genomes do not participate in these pathways or are assimilated into nonproductive structures that are degraded by cellular nucleases. The clearance of most of the vector DNA is concomitant with the rise of transgene expression levels. Therefore, less than a month after intramuscular administration, only a few genomes are stabilized and established as transcriptionally active. Interestingly, this time frame is similar to the one necessary *in vivo* for naked plasmid DNA to associate with histones, resulting in hetero/euchromatin (50). Our data indicate that chromatinization occurs on episomal double-stranded circular rAAV when such a substrate is available.

The conversion of linear AAV genomes to double-stranded supercoiled circles has been seen *in vivo* for (i) single-stranded AAV vectors, (ii) double-stranded AAV vectors that are also called self-complementary rAAV, (iii) multiple serotypes (AAV1, -2, and -8), (iv) different target tissues (skeletal muscle, liver, heart), (v) animals of different levels of maturity (neonates and adults), (vi) early and late time points posttransduction, (vii) different vector copy numbers, and (viii) different species (mice, NHPs) (references 44, 64, 65, and 66 and data presented here). In skeletal muscle, cellular histone assembly on rAAV genomes could trigger stable transcription of the transgene from monomeric and concatemeric circles and alternatively may catalyze and/or protect the initial structural changes, including the slow conversion of double-stranded monomers to larger concatemers (21). Several histones are known to be implicated in the DNA repair machinery, such as H2AX and H1R variants (22, 27, 47), or in intermolecular recombination (22, 58) that could favor rAAV circularization or concatemerization. Further studies are required to address the existence and the nature of such a relationship between early changes of rAAV molecular structures and the chromatinization of rAAV genomes.

Changes in the dynamic chromatin structure are notably affected by posttranslational modifications of histones via alteration of their interaction with DNA and nuclear protein. Histone modifications act in diverse biological processes, such as gene expression regulation, DNA repair, and DNA condensation. Unlike in the *in vitro* studies using transformed cell lines where rAAV-mediated gene expression can be silenced due to integration into the cellular genome in a repressive chromatin environment and restored by HDAC inhibitors (9, 10), in our *in vivo* studies, the episomal chromatin structure of rAAV allows constitutive expression that can be sustained for years. Consequently, we wanted to determine if some persistent forms of rAAV are susceptible to epigenetic regulation through the use of an HDAC inhibitor (sodium phenylbutyrate). The literature does not clearly demonstrate the effect of such drugs on rAAV-mediated transgene expression. Indeed, using hydroxyurea, a cell cycling drug that is shown to act on histone acetylation, Lo et al. were unable to enhance transgene expression in the brains of mice transduced with rAAV (33). With our experimental settings, we did not manage to modify the LEA29Y expression level by a 3-month sodium phenylbutyrate treatment, nor did Rivera et al. in some primates transduced intramuscularly with rAAV (51). The inefficiency of sodium phenylbutyrate treatment on transgene expression could be due to instability and low retention of this drug (39). Nevertheless, sodium phenylbutyrate is used in clin-

ical studies to treat sickle cell anemia patients by stimulating the expression of fetal hemoglobin (18, 19, 28) or to increase SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients (4). As mentioned in references 3 and 48, epigenetic drugs may therefore be effective only at early times after rAAV injection, i.e., during or just after (i) the establishment of dsDNA circles, (ii) the organization of episomes into a chromatin-like structure, and (iii) appropriate intranuclear compartmentalization. If this is the case, it would provide a possible explanation for the unresponsiveness of the rAAV genome to the sodium phenylbutyrate treatment at late time points when stable vector structures have already been established.

In summary, we have demonstrated that rAAV vector genomes persist in extrachromosomal circular forms in the skeletal muscles of NHPs and that these episomes assimilate into active chromatin that mediates long-term transgene expression. In future studies, we will examine the epigenetic regulation of rAAV genomes *in situ*.

ACKNOWLEDGMENTS

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

This project was funded, in part, by INSERM, the University Hospital of Nantes, the Fondation d'Entreprises pour la Thérapie Génique en Pays de la Loire, the Association Française contre les Myopathies (AFM) awards 12263 to R.O.S. and 13063 to P.M., and Clinigene (a member of the European Networks of Excellence). This work was also performed under a cooperative agreement between INSERM, AFM, l'Établissement Français du Sang (EFS), and the University of Florida Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology.

REFERENCES

1. Beard, P. 1978. Mobility of histones on the chromosome of simian virus 40. *Cell* 15:955-967.
2. Bellard, M., P. Oudet, J. E. Germond, and P. Chambon. 1976. Subunit structure of simian-virus-40 minichromosome. *Eur. J. Biochem.* 70:543-553.
3. Ben-Asher, E., S. Bratosin, and Y. Aloni. 1982. Intracellular DNA of the parvovirus minute virus of mice is organized in a minichromosome structure. *J. Virol.* 41:1044-1054.
4. Brahe, C., T. Vitali, F. D. Tiziano, C. Angelozzi, A. M. Pinto, F. Borgo, U. Moscato, E. Bertini, E. Mercuri, and G. Neri. 2005. Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 13:256-259.
5. Brown, M., and J. Weber. 1982. Adenoassociated virus has a unique chromatin structure. *Can. J. Biochem.* 60:1001-1005.
6. Cereghini, S., and M. Yaniv. 1984. Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. *EMBO J.* 3:1243-1253.
7. Cervelli, T., J. A. Palacios, L. Zentilin, M. Mano, R. A. Schwartz, M. D. Weitzman, and M. Giacca. 2008. Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins. *J. Cell Sci.* 121:349-357.
8. Chen, S. J., J. Tazelaar, A. D. Mosconi, and J. M. Wilson. 2000. *In vivo* selection of hepatocytes transduced with adeno-associated viral vectors. *Mol. Ther.* 1:414-422.
9. Chen, W. Y., E. C. Bailey, S. L. McCune, J. Y. Dong, and T. M. Townes. 1997. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5798-5803.
10. Chen, W. Y., and T. M. Townes. 2000. Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:377-382.
11. Chenuaud, P., T. Larcher, J. E. Rabinowitz, N. Provost, B. Joussemet, H. Bujard, R. J. Samulski, D. Favre, and P. Mouflier. 2004. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* 9:410-418.
12. Choi, V. W., D. M. McCarty, and R. J. Samulski. 2006. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J. Virol.* 80:10346-10356.
13. Cremisi, C., P. F. Pignatti, O. Croissant, and M. Yaniv. 1975. Chromatin-like structures in polyoma virus and simian virus 10 lytic cycle. *J. Virol.* 17:204-211.
14. Deshmane, S. L., and N. W. Fraser. 1989. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63:943-947.
15. Doerig, C., G. McMaster, J. Sogo, H. Bruggmann, and P. Beard. 1986. Nucleoprotein complexes of minute virus of mice have a distinct structure different from that of chromatin. *J. Virol.* 58:817-824.
16. Donsante, A., D. G. Miller, Y. Li, C. Vogler, E. M. Brunt, D. W. Russell, and M. S. Sands. 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317:477.
17. Douar, A. M., K. Poulard, D. Stockholm, and O. Danos. 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J. Virol.* 75:1824-1833.
18. Dover, G. J., S. Brusilow, and S. Charache. 1994. Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 84:339-343.
19. Dover, G. J., S. Brusilow, and D. Samid. 1992. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. *N. Engl. J. Med.* 327:569-570.
20. Duan, D., P. Sharma, L. Dodus, Y. Zhang, S. Sanlioglu, Z. Yan, Y. Yue, Y. Ye, R. Lester, J. Yang, K. J. Fisher, and J. F. Engelhardt. 1999. Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J. Virol.* 73:161-169.
21. Duan, D., P. Sharma, J. Yang, Y. Yue, L. Dodus, Y. Zhang, K. J. Fisher, and J. F. Engelhardt. 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* 72:8568-8577.
22. Escargueil, A. E., D. G. Soares, M. Salvador, A. K. Larsen, and J. A. Henriques. What histone code for DNA repair? *Mutat. Res.*, in press.
23. Fisher, K. J., K. Jooss, J. Alston, Y. Yang, S. E. Haecker, K. High, R. Pathak, S. E. Raper, and J. M. Wilson. 1997. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat. Med.* 3:306-312.
24. Germond, J. E., B. Hirt, P. Oudet, M. Gross-Bellard, and P. Chambon. 1975. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1843-1847.
25. Griffith, J. D. 1975. Chromatin structure: deduced from a minichromosome. *Science* 187:1202-1203.
26. Grimm, D., K. Pandey, H. Nakai, T. A. Storm, and M. A. Kay. 2006. Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype, not vector genotype. *J. Virol.* 80:426-439.
27. Hashimoto, H., E. Sonoda, Y. Takami, H. Kimura, T. Nakayama, M. Tachibana, S. Takeda, and Y. Shinkai. 2007. Histone H1 variant, H1R is involved in DNA damage response. *DNA Repair* 6:1584-1595.
28. Hines, P., G. J. Dover, and L. M. Resar. 2008. Pulsed-dosing with oral sodium phenylbutyrate increases hemoglobin F in a patient with sickle cell anemia. *Pediatr. Blood Cancer* 50:357-359.
29. Inagaki, K., S. M. Lewis, X. Wu, C. Ma, D. J. Munroe, S. Fuess, T. A. Storm, M. A. Kay, and H. Nakai. 2007. DNA palindromes with a modest arm length of ≥ 20 base pairs are a significant target for recombinant adeno-associated virus vector integration in the liver, muscles, and heart in mice. *J. Virol.* 81:11290-11303.
30. Inagaki, K., C. Ma, T. A. Storm, M. A. Kay, and H. Nakai. 2007. The role of DNA-PKcs and Artemis in opening viral DNA hairpin termini in various tissues in mice. *J. Virol.* 81:11304-11321.
31. Kouzine, F., S. Sanford, Z. Elsha-Fell, and D. Levens. 2008. The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:146-154.
32. Larsen, C. P., T. C. Pearson, A. B. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L. A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerly, P. S. Linsley, and R. J. Peach. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant.* 5:443-453.
33. Lo, W. D., G. Qu, T. J. Sferza, R. Clark, R. Chen, and P. R. Johnson. 1999. Adeno-associated virus-mediated gene transfer to the brain: duration and modulation of expression. *Hum. Gene Ther.* 10:201-213.
34. Lu, F., J. Zhou, A. Wiedmer, K. Madden, Y. Yuan, and P. M. Lieberman. 2003. Chromatin remodeling of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 promoter correlates with reactivation from latency. *J. Virol.* 77:11425-11435.
35. Manno, C. S., A. J. Chew, S. Hutchison, P. J. Larson, R. W. Herzog, V. R. Arruda, S. J. Tai, M. V. Ragni, A. Thompson, M. Ozelo, L. B. Couto, D. G. Leonard, F. A. Johnson, A. McClelland, C. Scallan, E. Skarsgard, A. W. Flake, M. A. Kay, K. A. High, and B. Glader. 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101:2963-2972.
36. Marcus-Sekura, C. J., and B. J. Carter. 1983. Chromatin-like structure of adeno-associated virus DNA in infected cells. *J. Virol.* 48:79-87.
37. Miao, C. H., H. Nakai, A. R. Thompson, T. A. Storm, W. Chiu, R. O. Snyder, and M. A. Kay. 2000. Nonrandom transduction of recombinant adeno-asso-

- ciated virus vectors in mouse hepatocytes *in vivo*: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J. Virol.* 74:3793–3803.
38. Miao, C. H., R. O. Snyder, D. B. Schowalter, G. A. Patijn, B. Donahue, B. Winther, and M. A. Kay. 1998. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat. Genet.* 19:13–15. [Letter.]
 39. Monneret, C. 2005. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 40:1–13.
 40. Nakai, H., Y. Iwaki, M. A. Kay, and L. B. Couto. 1999. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J. Virol.* 73:5438–5447.
 41. Nakai, H., E. Montini, S. Fuess, T. A. Storm, M. Grompe, and M. A. Kay. 2003. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat. Genet.* 34:297–302.
 42. Nakai, H., X. Wu, S. Fuess, T. A. Storm, D. Munroe, E. Montini, S. M. Burgess, M. Grompe, and M. A. Kay. 2005. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J. Virol.* 79:3606–3614.
 43. Nakai, H., S. R. Yant, T. A. Storm, S. Fuess, L. Meuse, and M. A. Kay. 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J. Virol.* 75:6969–6976.
 44. Nathwani, A. C., J. T. Gray, C. Y. Ng, J. Zhou, Y. Spence, S. N. Waddington, E. G. Tuddenham, G. Kemball-Cook, J. McIntosh, M. Boon-Spijker, K. Mertens, and A. M. Davidoff. 2006. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood* 107:2653–2661.
 45. Newbold, J. E., H. Xin, M. Tencza, G. Sherman, J. Dean, S. Bowden, and S. Locarnini. 1995. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* 69:3350–3357.
 46. Okada, T., R. Uchibori, M. Iwata-Okada, M. Takahashi, T. Nomoto, M. Nonaka-Sarukawa, T. Ito, Y. Liu, H. Mizukami, A. Kume, E. Kobayashi, and K. Ozawa. 2006. A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol. Ther.* 13:738–746.
 47. Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10:886–895.
 48. Pilartz, M., and H. Jeske. 2003. Mapping of abutilon mosaic geminivirus minichromosomes. *J. Virol.* 77:10808–10818.
 49. Randall, S. K., and T. J. Kelly. 1992. The fate of parental nucleosomes during SV40 DNA replication. *J. Biol. Chem.* 267:14259–14265.
 50. Riu, E., Z. Y. Chen, H. Xu, C. Y. He, and M. A. Kay. 2007. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression *in vivo*. *Mol. Ther.* 15:1348–1355.
 51. Rivera, V. M., G. P. Gao, R. L. Grant, M. A. Schnell, P. W. Zoltick, L. W. Rozamus, T. Clackson, and J. M. Wilson. 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105:1424–1430.
 52. Schmidt, M., K. Schwarzwalder, C. Bartholomae, K. Zaoui, C. Ball, I. Pilz, S. Braun, H. Glimm, and C. von Kalle. 2007. High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat. Methods* 4:1051–1057.
 53. Schnepf, B. C., K. R. Clark, D. L. Klemanski, C. A. Pacak, and P. R. Johnson. 2003. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* 77:3495–3504.
 54. Schnepf, B. C., R. L. Jensen, C. L. Chen, P. R. Johnson, and K. R. Clark. 2005. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J. Virol.* 79:14793–14803.
 55. Shaw, J. E., L. F. Levinger, and C. W. Carter, Jr. 1979. Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *J. Virol.* 29:657–665.
 56. Smith, S., and B. Stillman. 1991. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. *EMBO J.* 10:971–980.
 57. Snyder, R. O., S. K. Spratt, C. Lagarde, D. Bohl, B. Kaspar, B. Sloan, L. K. Cohen, and O. Danos. 1997. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum. Gene Ther.* 8:1891–1900.
 58. Solczak, J., and M. Duguet. 1988. Effect of histone H1, poly(ethyleneglycol) and DNA concentration on intermolecular and intramolecular ligation by T4 DNA ligase. *Eur. J. Biochem.* 175:379–385.
 59. Spector, D. J. 2007. Default assembly of early adenovirus chromatin. *Virology* 359:116–125.
 60. Toromanoff, A., Y. Chereh, M. Guilbaud, M. Penaud-Budloo, R. O. Snyder, M. E. Haskins, J. Y. Deschamps, L. Guigand, G. Podevin, V. R. Arruda, K. A. High, H. H. Stedman, F. Rolling, I. Anegon, P. Moullier, and C. Le Guiner. Safety and efficacy of regional intravenous (RI) versus intramuscular (IM) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.*, in press.
 61. Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard, and W. Hillen. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7963–7968.
 62. Reference deleted.
 63. Vincenti, F., C. Larsen, A. Durrbach, T. Wekerle, B. Nashan, G. Blanche, P. Lang, J. Grinyo, P. F. Halloran, K. Solez, D. Hagerly, E. Levy, W. Zhou, K. Natarajan, and B. Charpentier. 2005. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 353:770–781.
 64. Vincent-Lacaze, N., R. O. Snyder, R. Gluzman, D. Bohl, C. Lagarde, and O. Danos. 1999. Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J. Virol.* 73:1949–1955.
 65. Wang, Z., H. L. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, and X. Xiao. 2003. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* 10:2105–2111.
 66. Wang, Z., T. Zhu, C. Qiao, L. Zhou, B. Wang, J. Zhang, C. Chen, J. Li, and X. Xiao. 2005. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* 23:321–328.
 67. Xiao, X., J. Li, and R. J. Samulski. 1996. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* 70:8098–8108.
 68. Yang, J., W. Zhou, Y. Zhang, T. Zidon, T. Ritchie, and J. F. Engelhardt. 1999. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J. Virol.* 73:9468–9477.
 69. Zaoui, K., M. Schmidt, D. E. Sabatino, F. R. Khazi, H. Glimm, J. Sun, K. A. High, and C. von Kalle. 2004. Sensitive molecular detection of various stable episomal concatemeric and integrated forms of rAAV2 after long-term expression *in vivo*. *Mol. Ther.* 9:S131.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ACLAND, G.M., G.D. AGUIRRE, J. BENNETT, T.S. ALEMAN, A.V. CIDECIYAN, J. BENNICELLI, N.S. DEJNEKA, S.E. PEARCE-KELLING, A.M. MAGUIRE, K. PALCZEWSKI, W.W. HAUSWIRTH, and S.G. JACOBSON. 2005. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther.* 12:1072-82.
- AHN, A.H., and L.M. KUNKEL. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet.* 3:283-91.
- AKACHE, B., D. GRIMM, K. PANDEY, S.R. YANT, H. XU, and M.A. KAY. 2006. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol.* 80:9831-6.
- AKACHE, B., D. GRIMM, X. SHEN, S. FUESS, S.R. YANT, D.S. GLAZER, J. PARK, and M.A. KAY. 2007. A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8. *Mol Ther.* 15:330-9.
- 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, and 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 Ther.* 13:29-39.
- ALEGRE, M.L., K.A. FRAUWIRTH, and C.B. THOMPSON. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol.* 1:220-8.
- ALEXANDER, I.E., S.C. CUNNINGHAM, G.J. LOGAN, and J. CHRISTODOULOU. 2008. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Ther.* 15:831-9.
- ALISKY, J.M., S.M. HUGHES, S.L. SAUTER, D. JOLLY, T.W. DUBENSKY, JR., P.D. STABER, J.A. CHIORINI, and B.L. DAVIDSON. 2000. Transduction of murine cerebellar neurons with recombinant FIV and AAV5 vectors. *Neuroreport.* 11:2669-73.
- ALLOCCA, M., C. MUSSOLINO, M. GARCIA-HOYOS, D. SANGES, C. IODICE, M. PETRILLO, L.H. VANDENBERGHE, J.M. WILSON, V. MARIGO, E.M. SURACE, and A. AURICCHIO. 2007. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol.* 81:11372-80.
- ARRUDA, V.R., P.A. FIELDS, R. MILNER, L. WAINWRIGHT, M.P. DE MIGUEL, P.J. DONOVAN, R.W. HERZOG, T.C. NICHOLS, J.A. BIEGEL, M. RAZAVI, M. DAKE, D. HUFF, A.W. FLAKE, L. COUTO, M.A. KAY, and K.A. HIGH. 2001a. Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther.* 4:586-92.
- ARRUDA, V.R., J.N. HAGSTROM, J. DEITCH, T. HEIMAN-PATTERSON, R.M. CAMIRE, K. CHU, P.A. FIELDS, R.W. HERZOG, L.B. COUTO, P.J. LARSON, and K.A. HIGH. 2001b. Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood.* 97:130-8.
- ARRUDA, V.R., J. SCHUETTRUMPF, R.W. HERZOG, T.C. NICHOLS, N. ROBINSON, Y. LOTFI, F. MINGOZZI, W. XIAO, L.B. COUTO, and K.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.* 103:85-92.
- ARRUDA, V.R., H.H. STEDMAN, T.C. NICHOLS, M.E. HASKINS, M. NICHOLSON, R.W. HERZOG, L.B. COUTO, and K.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.* 105:3458-64.
- ASOKAN, A., J.B. HAMRA, L. GOVINDASAMY, M. AGBANDJE-MCKENNA, and R.J. SAMULSKI. 2006. Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol.* 80:8961-9.

- BANTEL-SCHAAL, U., B. HUB, and J. KARTENBECK. 2002. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J Virol.* 76:2340-9.
- BARTLETT, J.S., J. KLEINSCHMIDT, R.C. BOUCHER, and R.J. SAMULSKI. 1999. Targeted adeno-associated virus vector transduction of nonpermissive cells mediated by a bispecific F(ab'gamma)2 antibody. *Nat Biotechnol.* 17:181-6.
- BARTLETT, J.S., R. WILCHER, and R.J. SAMULSKI. 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 74:2777-85.
- BELL, P., A.D. MOSCIONI, R.J. MCCARTER, D. WU, G. GAO, A. HOANG, J.C. SANMIGUEL, X. SUN, N.A. WIVEL, S.E. RAPER, E.E. FURTH, M.L. BATSHAW, and J.M. WILSON. 2006. Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Mol Ther.* 14:34-44.
- BELL, P., L. WANG, C. LEBHERZ, D.B. FLIEDER, M.S. BOVE, D. WU, G.P. GAO, J.M. WILSON, and N.A. WIVEL. 2005. No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. *Mol Ther.* 12:299-306.
- BENIGNI, A., S. TOMASONI, L.A. TURKA, L. LONGARETTI, L. ZENTILIN, M. MISTER, A. PEZZOTTA, N. AZZOLLINI, M. NORIS, S. CONTI, M. ABBATE, M. GIACCA, and G. REMUZZI. 2006. Adeno-associated virus-mediated CTLA4Ig gene transfer protects MHC-mismatched renal allografts from chronic rejection. *J Am Soc Nephrol.* 17:1665-72.
- BERNS, K.I., and C. GIRAUD. 1996. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 218:1-23.
- BLANKINSHIP, M.J., P. GREGOREVIC, J.M. ALLEN, S.Q. HARPER, H. HARPER, C.L. HALBERT, D.A. MILLER, and J.S. CHAMBERLAIN. 2004. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther.* 10:671-8.
- BOASSO, A., J.P. HERBEUVAL, A.W. HARDY, C. WINKLER, and G.M. SHEARER. 2005. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood.* 105:1574-81.
- BOHL, D., A. BOSCH, A. CARDONA, A. SALVETTI, and J.M. HEARD. 2000. Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle. *Blood.* 95:2793-8.
- BOHL, D., A. SALVETTI, P. MOULLIER, and J.M. HEARD. 1998. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood.* 92:1512-7.
- BOSTICK, B., A. GHOSH, Y. YUE, C. LONG, and D. DUAN. 2007. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther.* 14:1605-9.
- BOWEN, D.G., G.W. MCCAUGHAN, and P. BERTOLINO. 2005. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol.* 26:512-7.
- BRANDEN, L.J., B. CHRISTENSSON, and C.I. SMITH. 2001. In vivo nuclear delivery of oligonucleotides via hybridizing bifunctional peptides. *Gene Ther.* 8:84-7.
- BRANTLY, M.L., L.T. SPENCER, M. HUMPHRIES, T.J. CONLON, C.T. SPENCER, A. POIRIER, W. GARLINGTON, D. BAKER, S. SONG, K.I. BERNS, N. MUZYCZKA, R.O. SNYDER, B.J. BYRNE, and T.R. FLOTTE. 2006. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther.* 17:1177-86.
- BRIGHAM, K.L., K.B. LANE, B. MEYRICK, A.A. STECENKO, S. STRACK, D.R. CANNON, M. CAUDILL, and A.E. CANONICO. 2000. Transfection of nasal

- mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy. *Hum Gene Ther.* 11:1023-32.
- BROCKSTEDT, D.G., G.M. PODSAKOFF, L. FONG, G. KURTZMAN, W. MUELLER-RUCHHOLTZ, and E.G. ENGLEMAN. 1999. Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol.* 92:67-75.
- BRUNNER, M.C., C.A. CHAMBERS, F.K. CHAN, J. HANKE, A. WINOTO, and J.P. ALLISON. 1999. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol.* 162:5813-20.
- BRUNZELL, J., and S. DEEB. 2001. Familial lipoprotein lipase deficiency, ApoCII deficiency, and hepatic lipase deficiency.
- BURGER, C., O.S. GORBATYUK, M.J. VELARDO, C.S. PEDEN, P. WILLIAMS, S. ZOLOTUKHIN, P.J. REIER, R.J. MANDEL, and N. MUZYCZKA. 2004. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther.* 10:302-17.
- BURGER, C., K. NASH, and R.J. MANDEL. 2005. Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Hum Gene Ther.* 16:781-91.
- CABRIAN, K.M., K.K. BERRY, W.W. SHUFORD, R.S. MITTLER, J.N. RODGERS, and P.S. LINSLEY. 1996. Suppression of T-cell-dependent immune responses in monkeys by CTLA4Ig. *Transplant Proc.* 28:3261-2.
- CAO, O., E. DOBRZYNSKI, L. WANG, S. NAYAK, B. MINGLE, C. TERHORST, and R.W. HERZOG. 2007. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood.* 110:1132-40.
- CAO, O., and R.W. HERZOG. 2008. TLR3 signaling does not affect organ-specific immune responses to factor IX in AAV gene therapy. *Blood.* 112:910-1.
- CARROLL, M.C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 5:981-6.
- CARTER, B.J. 2005. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther.* 16:541-50.
- CAVAZZANA-CALVO, M., S. HACEIN-BEY, G. DE SAINT BASILE, F. GROSS, E. YVON, P. NUSBAUM, F. SELZ, C. HUE, S. CERTAIN, J.L. CASANOVA, P. BOUSSO, F.L. DEIST, and A. FISCHER. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 288:669-72.
- CHAO, H., Y. LIU, J. RABINOWITZ, C. LI, R.J. SAMULSKI, and C.E. WALSH. 2000. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther.* 2:619-23.
- CHAO, H., S.G. MANSFIELD, R.C. BARTEL, S. HIRIYANNA, L.G. MITCHELL, M.A. GARCIA-BLANCO, and C.E. WALSH. 2003. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med.* 9:1015-9.
- CHAO, H., P.E. MONAHAN, Y. LIU, R.J. SAMULSKI, and C.E. WALSH. 2001. Sustained and complete phenotype correction of hemophilia B mice following intramuscular injection of AAV1 serotype vectors. *Mol Ther.* 4:217-22.
- CHAO, H., L. SUN, A. BRUCE, X. XIAO, and C.E. WALSH. 2002. Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther.* 5:716-22.
- CHEN, C.L., R.L. JENSEN, B.C. SCHNEPP, M.J. CONNELL, R. SHELL, T.J. SFERRA, J.S. BARTLETT, K.R. CLARK, and P.R. JOHNSON. 2005. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol.* 79:14781-92.

- CHEN, H., C.E. LILLEY, Q. YU, D.V. LEE, J. CHOU, I. NARVAIZA, N.R. LANDAU, and M.D. WEITZMAN. 2006. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr Biol.* 16:480-5.
- CHEN, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 4:336-47.
- CHEN, Z., L. LU, J. LI, X. XIAO, J.J. FUNG, and S. QIAN. 2003. Prolonged survival of heart allografts transduced with AAV-CTLA4Ig. *Microsurgery.* 23:489-93.
- CHENUAUD, P., T. LARCHER, J.E. RABINOWITZ, N. PROVOST, Y. CHEREL, N. CASADEVALL, R.J. SAMULSKI, and P. MOULLIER. 2004a. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood.* 103:3303-4.
- CHENUAUD, P., T. LARCHER, J.E. RABINOWITZ, N. PROVOST, B. JOUSSEMET, H. BUJARD, R.J. SAMULSKI, D. FAVRE, and P. MOULLIER. 2004b. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther.* 9:410-8.
- CHIRMULE, N., W. XIAO, A. TRUNEH, M.A. SCHNELL, J.V. HUGHES, P. ZOLTICK, and J.M. WILSON. 2000. Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol.* 74:2420-5.
- CHOI, V.W., D.M. MCCARTY, and R.J. SAMULSKI. 2006. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol.* 80:10346-56.
- CLACKSON, T. 2000. Regulated gene expression systems. *Gene Ther.* 7:120-5.
- CLARK, K.R., T.J. SFERRA, and P.R. JOHNSON. 1997. Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther.* 8:659-69.
- CORDIER, L., G.P. GAO, A.A. HACK, E.M. MCNALLY, J.M. WILSON, N. CHIRMULE, and H.L. SWEENEY. 2001. Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther.* 12:205-15.
- CORDIER, L., A.A. HACK, M.O. SCOTT, E.R. BARTON-DAVIS, G. GAO, J.M. WILSON, E.M. MCNALLY, and H.L. SWEENEY. 2000. Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Mol Ther.* 1:119-29.
- COURA RDOS, S., and N.B. NARDI. 2007. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J.* 4:99.
- COUTO, L., A. PARKER, and J.W. GORDON. 2004. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gene Ther.* 15:287-91.
- CRYSTAL, R.G. 1991. Alpha 1-antitrypsin deficiency: pathogenesis and treatment. *Hosp Pract (Off Ed).* 26:81-4, 88-9, 93-4.
- DAVIDOFF, A.M., J.T. GRAY, C.Y. NG, Y. ZHANG, J. ZHOU, Y. SPENCE, Y. BAKAR, and A.C. NATHWANI. 2005. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther.* 11:875-88.
- DAVIDSON, B.L., C.S. STEIN, J.A. HETH, I. MARTINS, R.M. KOTIN, T.A. DERKSEN, J. ZABNER, A. GHODSI, and J.A. CHIORINI. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3428-32.
- DE, B.P., A. HEGUY, N.R. HACKETT, B. FERRIS, P.L. LEOPOLD, J. LEE, L. PIERRE, G. GAO, J.M. WILSON, and R.G. CRYSTAL. 2006. High levels of persistent

- expression of alpha1-antitrypsin mediated by the nonhuman primate serotype rh.10 adeno-associated virus despite preexisting immunity to common human adeno-associated viruses. *Mol Ther.* 13:67-76.
- DEJNEKA, N.S., A. AURICCHIO, A.M. MAGUIRE, X. YE, G.P. GAO, J.M. WILSON, and J. BENNETT. 2001. Pharmacologically regulated gene expression in the retina following transduction with viral vectors. *Gene Ther.* 8:442-6.
- DEUSCHLE, U., W.K. MEYER, and H.J. THIESEN. 1995. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol.* 15:1907-14.
- DI PASQUALE, G., B.L. DAVIDSON, C.S. STEIN, I. MARTINS, D. SCUDIERO, A. MONKS, and J.A. CHIORINI. 2003. Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med.* 9:1306-12.
- DING, W., L. ZHANG, Z. YAN, and J.F. ENGELHARDT. 2005. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* 12:873-80.
- DOBRYNSKI, E., and R.W. HERZOG. 2005. Tolerance induction by viral in vivo gene transfer. *Clin Med Res.* 3:234-40.
- DOBRYNSKI, E., F. MINGOZZI, Y.L. LIU, E. BENDO, O. CAO, L. WANG, and R.W. HERZOG. 2004. Induction of antigen-specific CD4+ T-cell anergy and deletion by in vivo viral gene transfer. *Blood.* 104:969-77.
- DONG, J.Y., P.D. FAN, and R.A. FRIZZELL. 1996. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther.* 7:2101-12.
- DONSANTE, A., D.G. MILLER, Y. LI, C. VOGLER, E.M. BRUNT, D.W. RUSSELL, and M.S. SANDS. 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science.* 317:477.
- DONSANTE, A., C. VOGLER, N. MUZYCZKA, J.M. CRAWFORD, J. BARKER, T. FLOTTE, M. CAMPBELL-THOMPSON, T. DALY, and M.S. SANDS. 2001. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* 8:1343-6.
- DOUAR, A.M., K. POULARD, D. STOCKHOLM, and O. DANOS. 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol.* 75:1824-33.
- DRESSMAN, D., K. ARAISHI, M. IMAMURA, T. SASAOKA, L.A. LIU, E. ENGVALL, and E.P. HOFFMAN. 2002. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther.* 13:1631-46.
- DREW, H.R., L.J. LOCKETT, and G.W. BOTH. 2007. Increased complexity of wild-type adeno-associated virus-chromosomal junctions as determined by analysis of unselected cellular genomes. *J Gen Virol.* 88:1722-32.
- DUAN, D., Q. LI, A.W. KAO, Y. YUE, J.E. PESSIN, and J.F. ENGELHARDT. 1999a. Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol.* 73:10371-6.
- DUAN, D., P. SHARMA, L. DUDUS, Y. ZHANG, S. SANLIOGLU, Z. YAN, Y. YUE, Y. YE, R. LESTER, J. YANG, K.J. FISHER, and J.F. ENGELHARDT. 1999b. Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol.* 73:161-9.
- DUAN, D., P. SHARMA, J. YANG, Y. YUE, L. DUDUS, Y. ZHANG, K.J. FISHER, and J.F. ENGELHARDT. 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol.* 72:8568-77.

- DUAN, D., Z. YAN, Y. YUE, W. DING, and J.F. ENGELHARDT. 2001. Enhancement of muscle gene delivery with pseudotyped adeno-associated virus type 5 correlates with myoblast differentiation. *J Virol.* 75:7662-71.
- DURING, M.J., C.W. SYMES, P.A. LAWLOR, J. LIN, J. DUNNING, H.L. FITZSIMONS, D. POULSEN, P. LEONE, R. XU, B.L. DICKER, J. LIPSKI, and D. YOUNG. 2000. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science.* 287:1453-60.
- ERLES, K., P. SEBOKOVA, and J.R. SCHLEHOFER. 1999. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol.* 59:406-11.
- EVANS, B.K., and C. GOYNE. 1991. Duchenne's muscular dystrophy: review and recent scientific findings. *Am J Med Sci.* 302:118-23.
- FABB, S.A., D.J. WELLS, P. SERPENTE, and G. DICKSON. 2002. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet.* 11:733-41.
- FAVRE, D., V. BLOUIN, N. PROVOST, R. SPISEK, F. PORROT, D. BOHL, F. MARME, Y. CHEREL, A. SALVETTI, B. HURTREL, J.M. HEARD, Y. RIVIERE, and P. MOULLIER. 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., N. PROVOST, V. BLOUIN, G. BLANCHO, Y. CHEREL, A. SALVETTI, and P. MOULLIER. 2001. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther.* 4:559-66.
- FERRER, A., H. FOSTER, K.E. WELLS, G. DICKSON, and D.J. WELLS. 2004. Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Ther.* 11:884-93.
- FIELDS, P.A., V.R. ARRUDA, E. ARMSTRONG, K. CHU, F. MINGOZZI, J.N. HAGSTROM, R.W. HERZOG, and K.A. HIGH. 2001. Risk and prevention of anti-factor IX formation in AAV-mediated gene transfer in the context of a large deletion of F9. *Mol Ther.* 4:201-10.
- FIELDS, P.A., D.W. KOWALCZYK, V.R. ARRUDA, E. ARMSTRONG, M.L. MCCLELAND, J.N. HAGSTROM, K.J. PASI, H.C. ERTL, R.W. HERZOG, and K.A. HIGH. 2000. Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther.* 1:225-35.
- FISHER, K.J., K. JOOSS, J. ALSTON, Y. YANG, S.E. HAECKER, K. HIGH, R. PATHAK, S.E. RAPER, and J.M. WILSON. 1997. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med.* 3:306-12.
- FLOTTE, T.R. 2004. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther.* 11:805-10.
- FLOTTE, T.R., M.L. BRANTLY, L.T. SPENCER, B.J. BYRNE, C.T. SPENCER, D.J. BAKER, and M. HUMPHRIES. 2004. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther.* 15:93-128.
- FLOTTE, T.R., T.J. CONLON, A. POIRIER, M. CAMPBELL-THOMPSON, and B.J. BYRNE. 2007. 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.* 18:245-56.

- FLOTTE, T.R., E.M. SCHWIEBERT, P.L. ZEITLIN, B.J. CARTER, and W.B. GUGGINO. 2005. Correlation between DNA transfer and cystic fibrosis airway epithelial cell correction after recombinant adeno-associated virus serotype 2 gene therapy. *Hum Gene Ther.* 16:921-8.
- FLOTTE, T.R., P.L. ZEITLIN, T.C. REYNOLDS, A.E. HEALD, P. PEDERSEN, S. BECK, C.K. CONRAD, L. BRASS-ERNST, M. HUMPHRIES, K. SULLIVAN, R. WETZEL, G. TAYLOR, B.J. CARTER, and W.B. GUGGINO. 2003. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther.* 14:1079-88.
- FOLLIOT, S., D. BRIOT, H. CONRATH, N. PROVOST, Y. CHEREL, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2003. Sustained tetracycline-regulated transgene expression in vivo in rat retinal ganglion cells using a single type 2 adeno-associated viral vector. *J Gene Med.* 5:493-501.
- FRAITES, T.J., JR., M.R. SCHLEISSING, R.A. SHANELY, G.A. WALTER, D.A. CLOUTIER, I. ZOLOTUKHIN, D.F. PAULY, N. RABEN, P.H. PLOTZ, S.K. POWERS, P.D. KESSLER, and B.J. BYRNE. 2002. Correction of the enzymatic and functional deficits in a model of Pompe disease using adeno-associated virus vectors. *Mol Ther.* 5:571-8.
- FRANCO, L.M., B. SUN, X. YANG, A. BIRD, H. ZHANG, A. SCHNEIDER, T. BROWN, S.P. YOUNG, T.M. CLAY, A. AMALFITANO, Y.T. CHEN, and D.D. KOEBERL. 2005. Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II. *Mol Ther.* 12:876-84.
- FRASER, J.H., M. RINCON, K.D. MCCOY, and G. LE GROS. 1999. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur J Immunol.* 29:838-44.
- FREDERICKSON, R.M., B.J. CARTER, and A.M. PILARO. 2003. Nonclinical toxicology in support of licensure of gene therapies. Arlington, VA, USA, March 13-14, 2003. *Mol Ther.* 8:8-10.
- FREUNDLIEB, S., C. SCHIRRA-MULLER, and H. BUJARD. 1999. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med.* 1:4-12.
- GALLEZ-HAWKINS, G., X. LI, A.E. FRANCK, L. THAO, S.F. LACEY, D.J. DIAMOND, and J.A. ZAIA. 2004. DNA and low titer, helper-free, recombinant AAV prime-boost vaccination for cytomegalovirus induces an immune response to CMV-pp65 and CMV-IE1 in transgenic HLA A*0201 mice. *Vaccine.* 23:819-26.
- GAO, G., C. LEBHERZ, D.J. WEINER, R. GRANT, R. CALCEDO, B. MCCULLOUGH, A. BAGG, Y. ZHANG, and J.M. WILSON. 2004a. Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood.* 103:3300-2.
- GAO, G., L.H. VANDENBERGHE, M.R. ALVIRA, Y. LU, R. CALCEDO, X. ZHOU, and J.M. WILSON. 2004b. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 78:6381-8.
- GAO, G., L.H. VANDENBERGHE, and J.M. WILSON. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 5:285-97.
- GAO, G.P., M.R. ALVIRA, L. WANG, R. CALCEDO, J. JOHNSTON, and J.M. WILSON. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11854-9.
- GAO, G.P., Y. LU, X. SUN, J. JOHNSTON, R. CALCEDO, R. GRANT, and J.M. WILSON. 2006. High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-

- associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol.* 80:6192-4.
- GAUDET, D., J. MÉTHOT, C. ESSIEMBRE, D. BRISSON, S. VAN DEVENTER, A. KLEEFSTRA, and J. MEULENBERG. 2008. Biodistribution of AAV1-LPL^{S447X} vector co-administered with immunosuppression to lipoprotein lipase deficient patients in a phase II study. *Mol Ther.* 16:S369.
- GENOVESE, M.C., M. SCHIFF, M. LUGGEN, J.C. BECKER, R. ARANDA, J. TENG, T. LI, N. SCHMIDELY, M. LE BARS, and M. DOUGADOS. 2008. Efficacy and safety of the selective co-stimulation modulator abatacept following 2 years of treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to anti-tumour necrosis factor therapy. *Ann Rheum Dis.* 67:547-54.
- GIGOUT, L., P. REBOLLO, N. CLEMENT, K.H. WARRINGTON, JR., N. MUZYCZKA, R.M. LINDEN, and T. WEBER. 2005. Altering AAV tropism with mosaic viral capsids. *Mol Ther.* 11:856-65.
- GIROD, A., M. RIED, C. WOBUS, H. LAHM, K. LEIKE, J. KLEINSCHMIDT, G. DELEAGE, and M. HALLEK. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med.* 5:1052-6.
- GORMAN, L., D. SUTER, V. EMERICK, D. SCHUMPERLI, and R. KOLE. 1998. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4929-34.
- GOSSEN, M., and H. BUJARD. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5547-51.
- GOSSEN, M., S. FREUNDLIEB, G. BENDER, G. MULLER, W. HILLEN, and H. BUJARD. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science.* 268:1766-9.
- GOYENVALLE, A., A. VULIN, F. FOUGEROUSSE, F. LETURCQ, J.C. KAPLAN, L. GARCIA, and O. DANOS. 2004. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science.* 306:1796-9.
- GRACA, L., S. THOMPSON, C.Y. LIN, E. ADAMS, S.P. COBBOLD, and H. WALDMANN. 2002. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol.* 168:5558-65.
- GREELISH, J.P., L.T. SU, E.B. LANKFORD, J.M. BURKMAN, H. CHEN, S.K. KONIG, I.M. MERCIER, P.R. DESJARDINS, M.A. MITCHELL, X.G. ZHENG, J. LEFEROVICH, G.P. GAO, R.J. BALICE-GORDON, J.M. WILSON, and H.H. STEDMAN. 1999. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med.* 5:439-43.
- GREGOREVIC, P., M.J. BLANKINSHIP, J.M. ALLEN, R.W. CRAWFORD, L. MEUSE, D.G. MILLER, D.W. RUSSELL, and J.S. CHAMBERLAIN. 2004. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 10:828-34.
- GRIEGER, J.C., and R.J. SAMULSKI. 2005. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol.* 79:9933-44.
- GRIMM, D., and M.A. KAY. 2003. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther.* 3:281-304.
- GRIMM, D., A. KERN, K. RITTNER, and J.A. KLEINSCHMIDT. 1998. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther.* 9:2745-60.

- GROHMANN, U., C. ORABONA, F. FALLARINO, C. VACCA, F. CALCINARO, A. FALORNI, P. CANDELORO, M.L. BELLADONNA, R. BIANCHI, M.C. FIORETTI, and P. PUC CETTI. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* 3:1097-101.
- GROSS, D.A., M. LEBOEUF, B. GJATA, O. DANOS, and J. DAVOUST. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit immune-mediated transgene rejection. *Blood.* 102:4326-8.
- GUGLIERI, M., V. STRAUB, K. BUSHBY, and H. LOCHMULLER. 2008. Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol.* 21:576-84.
- GUILLOT, C., P. MATHIEU, H. COATHALEM, B. LE MAUFF, M.G. CASTRO, L. TESSON, C. USAL, T. LAUMONIER, S. BROUARD, J.P. SOULILLOU, P.R. LOWENSTEIN, M.C. CUTURI, and I. ANEGON. 2000. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol.* 164:5258-68.
- HALBERT, C.L., J.M. ALLEN, and 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. *J Virol.* 75:6615-24.
- HALBERT, C.L., S.L. LAM, and A.D. MILLER. 2007. High-efficiency promoter-dependent transduction by adeno-associated virus type 6 vectors in mouse lung. *Hum Gene Ther.* 18:344-54.
- HALBERT, C.L., A.D. MILLER, S. MCNAMARA, J. EMERSON, R.L. GIBSON, B. RAMSEY, and M.L. AITKEN. 2006. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther.* 17:440-7.
- HALBERT, C.L., E.A. RUTLEDGE, J.M. ALLEN, D.W. RUSSELL, and A.D. MILLER. 2000. Repeat transduction in the mouse lung by using adeno-associated virus vectors with different serotypes. *J Virol.* 74:1524-32.
- HALBERT, C.L., T.A. STANDAERT, C.B. WILSON, and A.D. MILLER. 1998. Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol.* 72:9795-805.
- HALLORAN, P.F. 2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 351:2715-29.
- HARDING, T.C., B.J. GEDDES, D. MURPHY, D. KNIGHT, and J.B. UNEY. 1998. Switching transgene expression in the brain using an adenoviral tetracycline-regulatable system. *Nat Biotechnol.* 16:553-5.
- HARTIGAN-O'CONNOR, D., C.J. KIRK, R. CRAWFORD, J.J. MULE, and J.S. CHAMBERLAIN. 2001. Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol Ther.* 4:525-33.
- HAUCK, B., L. CHEN, and W. XIAO. 2003. Generation and characterization of chimeric recombinant AAV vectors. *Mol Ther.* 7:419-25.
- HAUCK, B., and W. XIAO. 2003. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol.* 77:2768-74.
- HAUCK, B., W. ZHAO, K. HIGH, and W. XIAO. 2004. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol.* 78:13678-86.
- HENDRIE, P.C., and D.W. RUSSELL. 2005. Gene targeting with viral vectors. *Mol Ther.* 12:9-17.
- HENSLEY, S.E., and A. AMALFITANO. 2007. Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors. *Mol Ther.* 15:1417-22.

- HERCHENRODER, O., J.C. HAHNE, W.K. MEYER, H.J. THIESEN, and J. SCHNEIDER. 1999. Repression of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the human KRAB domain results in inhibition of virus production. *Biochim Biophys Acta*. 1445:216-23.
- HERNANDEZ, Y.J., J. WANG, W.G. KEARNS, S. LOILER, A. POIRIER, and T.R. FLOTTE. 1999. Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J Virol*. 73:8549-58.
- HERZOG, R.W. 2007. Immune responses to AAV capsid: are mice not humans after all? *Mol Ther*. 15:649-50.
- HERZOG, R.W., and E. DOBRZYNSKI. 2004. Immune implications of gene therapy for hemophilia. *Semin Thromb Hemost*. 30:215-26.
- HERZOG, R.W., P.A. FIELDS, V.R. ARRUDA, J.O. BRUBAKER, E. ARMSTRONG, D. MCCLINTOCK, D.A. BELLINGER, L.B. COUTO, T.C. NICHOLS, and K.A. HIGH. 2002. Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum Gene Ther*. 13:1281-91.
- HERZOG, R.W., J.N. HAGSTROM, S.H. KUNG, S.J. TAI, J.M. WILSON, K.J. FISHER, and K.A. HIGH. 1997. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5804-9.
- HERZOG, R.W., J.D. MOUNT, V.R. ARRUDA, K.A. HIGH, and C.D. LOTHROP, JR. 2001. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther*. 4:192-200.
- HERZOG, R.W., E.Y. YANG, L.B. COUTO, J.N. HAGSTROM, D. ELWELL, P.A. FIELDS, M. BURTON, D.A. BELLINGER, M.S. READ, K.M. BRINKHOUS, G.M. PODSAKOFF, T.C. NICHOLS, G.J. KURTZMAN, and K.A. HIGH. 1999. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med*. 5:56-63.
- HIGH, K.A. 2003. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. *Semin Thromb Hemost*. 29:107-20.
- HILDINGER, M., A. AURICCHIO, G. GAO, L. WANG, N. CHIRMULE, and J.M. WILSON. 2001. Hybrid vectors based on adeno-associated virus serotypes 2 and 5 for muscle-directed gene transfer. *J Virol*. 75:6199-203.
- HIRATA, R.K., and D.W. RUSSELL. 2000. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors. *J Virol*. 74:4612-20.
- HOFFMAN, B.E., E. DOBRZYNSKI, L. WANG, L. HIRAO, F. MINGOZZI, O. CAO, and R.W. HERZOG. 2007. Muscle as a target for supplementary factor IX gene transfer. *Hum Gene Ther*. 18:603-13.
- HUTTNER, N.A., A. GIROD, L. PERABO, D. EDBAUER, J.A. KLEINSCHMIDT, H. BUNING, and M. HALLEK. 2003. Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene Ther*. 10:2139-47.
- INAGAKI, K., S. FUESS, T.A. STORM, G.A. GIBSON, C.F. MCTIERNAN, M.A. KAY, and H. NAKAI. 2006. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*. 14:45-53.
- JACOBSON, S.G., S.L. BOYE, T.S. ALEMAN, T.J. CONLON, C.J. ZEISS, A.J. ROMAN, A.V. CIDECIYAN, S.B. SCHWARTZ, A.M. KOMAROMY, M. DOOBRAJH, A.Y. CHEUNG, A. SUMAROKA, S.E. PEARCE-KELLING, G.D. AGUIRRE, S. KAUSHAL, A.M. MAGUIRE, T.R. FLOTTE, and W.W. HAUSWIRTH. 2006.

- Safety in nonhuman primates of ocular AAV2-RPE65, a candidate treatment for blindness in Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther.* 17:845-58.
- JANSON, C., S. MCPHEE, L. BILANIUK, J. HASELGROVE, M. TESTAIUTI, A. FREESE, D.J. WANG, D. SHERA, P. HURH, J. RUPIN, E. SASLOW, O. GOLDFARB, M. GOLDBERG, G. LARIJANI, W. SHARRAR, L. LIOUTERMAN, A. CAMP, E. KOLODNY, J. SAMULSKI, and P. LEONE. 2002. Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum Gene Ther.* 13:1391-412.
- JIANG, H., L.B. COUTO, S. PATARROYO-WHITE, T. LIU, D. NAGY, J.A. VARGAS, S. ZHOU, C.D. SCALLAN, J. SOMMER, S. VIJAY, F. MINGOZZI, K.A. HIGH, and G.F. PIERCE. 2006a. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood.* 108:3321-8.
- JIANG, H., D. LILLCRAP, S. PATARROYO-WHITE, T. LIU, X. QIAN, C.D. SCALLAN, S. POWELL, T. KELLER, M. MCMURRAY, A. LABELLE, D. NAGY, J.A. VARGAS, S. ZHOU, L.B. COUTO, and G.F. PIERCE. 2006b. Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood.* 108:107-15.
- JIANG, H., G.F. PIERCE, M.C. OZELO, E.V. DE PAULA, J.A. VARGAS, P. SMITH, J. SOMMER, A. LUK, C.S. MANNO, K.A. HIGH, and V.R. ARRUDA. 2006c. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther.* 14:452-5.
- JIANG, Z., E. FEINGOLD, S. KOCHANNEK, and P.R. CLEMENS. 2002. Systemic delivery of a high-capacity adenoviral vector expressing mouse CTLA4Ig improves skeletal muscle gene therapy. *Mol Ther.* 6:369-76.
- JIANG, Z., G. SCHIEDNER, S.C. GILCHRIST, S. KOCHANNEK, and P.R. CLEMENS. 2004a. CTLA4Ig delivered by high-capacity adenoviral vector induces stable expression of dystrophin in mdx mouse muscle. *Gene Ther.* 11:1453-61.
- JIANG, Z., G. SCHIEDNER, N. VAN ROOIJEN, C.C. LIU, S. KOCHANNEK, and P.R. CLEMENS. 2004b. Sustained muscle expression of dystrophin from a high-capacity adenoviral vector with systemic gene transfer of T cell costimulatory blockade. *Mol Ther.* 10:688-96.
- JOHNSON, P.R., B.C. SCHNEPP, M.J. CONNELL, D. ROHNE, S. ROBINSON, G.R. KRIVULKA, C.I. LORD, R. ZINN, D.C. MONTEFIORI, N.L. LETVIN, and K.R. CLARK. 2005. Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J Virol.* 79:955-65.
- JOHNSTON, J., J. TAZELAAR, V.M. RIVERA, T. CLACKSON, G.P. GAO, and J.M. WILSON. 2003. Regulated expression of erythropoietin from an AAV vector safely improves the anemia of beta-thalassemia in a mouse model. *Mol Ther.* 7:493-7.
- JOOSS, K., Y. YANG, K.J. FISHER, and J.M. WILSON. 1998. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J Virol.* 72:4212-23.
- KALUDOV, N., K.E. BROWN, R.W. WALTERS, J. ZABNER, and 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. *J Virol.* 75:6884-93.
- KASHIWAKURA, Y., K. TAMAYOSE, K. IWABUCHI, Y. HIRAI, T. SHIMADA, K. MATSUMOTO, T. NAKAMURA, M. WATANABE, K. OSHIMI, and H. DAIDA. 2005. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol.* 79:609-14.

- KAY, M.A., C.S. MANNO, M.V. RAGNI, P.J. LARSON, L.B. COUTO, A. MCCLELLAND, B. GLADER, A.J. CHEW, S.J. TAI, R.W. HERZOG, V. ARRUDA, F. JOHNSON, C. SCALLAN, E. SKARSGARD, A.W. FLAKE, and K.A. HIGH. 2000. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet.* 24:257-61.
- KEMPER, C., and J.P. ATKINSON. 2007. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 7:9-18.
- KESSLER, P.D., G.M. PODSAKOFF, X. CHEN, S.A. MCQUISTON, P.C. COLOSI, L.A. MATELIS, G.J. KURTZMAN, and B.J. BYRNE. 1996. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14082-7.
- KING, J.A., R. DUBIELZIG, D. GRIMM, and J.A. KLEINSCHMIDT. 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J.* 20:3282-91.
- KNAPP, L.A., L.F. CADAVID, M.E. EBERLE, S.J. KNECHTLE, R.E. BONTROP, and D.I. WATKINS. 1997. Identification of new mamu-DRB alleles using DGGE and direct sequencing. *Immunogenetics.* 45:171-9.
- KOPONEN, J.K., H. KANKKONEN, J. KANNASTO, T. WIRTH, W. HILLEN, H. BUJARD, and S. YLA-HERTTUALA. 2003. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10:459-66.
- KOTIN, R.M. 1994. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther.* 5:793-801.
- KOTIN, R.M., R.M. LINDEN, and K.I. BERNS. 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J.* 11:5071-8.
- KREMER, J.M., H.K. GENANT, L.W. MORELAND, A.S. RUSSELL, P. EMERY, C. ABUD-MENDOZA, J. SZECHINSKI, T. LI, J. TENG, J.C. BECKER, and R. WESTHOVENS. 2008. Results of a two-year followup study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate. *Arthritis Rheum.* 58:953-63.
- KREMER, J.M., R. WESTHOVENS, M. LEON, E. DI GIORGIO, R. ALTEN, S. STEINFELD, A. RUSSELL, M. DOUGADOS, P. EMERY, I.F. NUAMAH, G.R. WILLIAMS, J.C. BECKER, D.T. HAGERTY, and L.W. MORELAND. 2003. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med.* 349:1907-15.
- KWON, I., and D.V. SCHAFFER. 2008. Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. *Pharm Res.* 25:489-99.
- LAI, Y., Y. YUE, M. LIU, A. GHOSH, J.F. ENGELHARDT, J.S. CHAMBERLAIN, and D. DUAN. 2005. Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol.* 23:1435-9.
- LAROSA, D.F., and J.S. ORANGE. 2008. 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 121:S364-9; quiz S412.
- LARSEN, C.P., T.C. PEARSON, A.B. ADAMS, P. TSO, N. SHIRASUGI, E. STROBERTM, D. ANDERSON, S. COWAN, K. PRICE, J. NAEMURA, J. EMSWILER, J. GREENE, L.A. TURK, J. BAJORATH, R. TOWNSEND, D. HAGERTY, P.S. LINSLEY, and R.J. PEACH. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant.* 5:443-53.

- LASNE, F., L. MARTIN, J. DE CEARRIZ, T. LARCHER, P. MOULLIER, and P. CHENUAUD. 2004. "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther.* 10:409-10.
- LATTA-MAHIEU, M., M. ROLLAND, C. CAILLET, M. WANG, P. KENNEL, I. MAHFOUZ, I. LOQUET, J.F. DEDIEU, A. MAHFOUDI, E. TRANNOY, and V. THUILLIER. 2002. Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum Gene Ther.* 13:1611-20.
- LAUMONIER, T., N. POTIRON, F. BOEFFARD, C. CHAGNEAU, S. BROUARD, C. GUILLOT, J.P. SOULILLOU, I. ANEGON, and B. LE MAUFF. 2003. CTLA4Ig adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression. *Hum Gene Ther.* 14:561-75.
- LE BEC, C., and A.M. DOUAR. 2006. Gene therapy progress and prospects--vectorology: design and production of expression cassettes in AAV vectors. *Gene Ther.* 13:805-13.
- LE GUINER, C., K. STIEGER, R.O. SNYDER, F. ROLLING, and P. MOULLIER. 2007. Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther.* 7:334-46.
- LE, H.T., Q.C. YU, J.M. WILSON, and M.A. CROYLE. 2005. Utility of PEGylated recombinant adeno-associated viruses for gene transfer. *J Control Release.* 108:161-77.
- LE MEUR, G., K. STIEGER, A.J. SMITH, M. WEBER, J.Y. DESCHAMPS, D. NIVARD, A. MENDES-MADEIRA, N. PROVOST, Y. PEREON, Y. CHEREL, R.R. ALI, C. HAMEL, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2007. Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther.* 14:292-303.
- LEBHERZ, C., A. MAGUIRE, W. TANG, J. BENNETT, and J.M. WILSON. 2008. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med.* 10:375-82.
- LECHARDEUR, D., A.S. VERKMAN, and G.L. LUKACS. 2005. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:755-67.
- LEE, G.K., N. MAHESHRI, B. KASPAR, and D.V. SCHAFFER. 2005. PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization. *Biotechnol Bioeng.* 92:24-34.
- LENSCHOW, D.J., T.L. WALUNAS, and J.A. BLUESTONE. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14:233-58.
- LEONE, P., C.G. JANSON, L. BILANIUK, Z. WANG, F. SORGI, L. HUANG, R. MATALON, R. KAUL, Z. ZENG, A. FREESE, S.W. MCPHEE, E. MEE, and M.J. DURING. 2000. Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease. *Ann Neurol.* 48:27-38.
- LEVISETTI, M.G., P.A. PADRID, G.L. SZOT, N. MITTAL, S.M. MEEHAN, C.L. WARDRIP, G.S. GRAY, D.S. BRUCE, J.R. THISTLETHWAITE, JR., and J.A. BLUESTONE. 1997. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. *J Immunol.* 159:5187-91.
- LI, C., D.E. BOWLES, T. VAN DYKE, and R.J. SAMULSKI. 2005. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 12:913-25.
- LI, C., M. HIRSCH, A. ASOKAN, B. ZEITHAML, H. MA, T. KAFRI, and R.J. SAMULSKI. 2007a. Adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid-specific cytotoxic T lymphocytes eliminate only vector-transduced cells coexpressing the AAV2 capsid in vivo. *J Virol.* 81:7540-7.
- LI, H., S.L. MURPHY, W. GILES-DAVIS, S. EDMONSON, Z. XIANG, Y. LI, M.O. LASARO, K.A. HIGH, and H.C. ERTL. 2007b. Pre-existing AAV capsid-specific

- CD8⁺ T cells are unable to eliminate AAV-transduced hepatocytes. *Mol Ther.* 15:792-800.
- LIMBERIS, M.P., and J.M. WILSON. 2006. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:12993-8.
- LIN, J., Y. ZHI, L. MAYS, and J.M. WILSON. 2007a. Vaccines based on novel adeno-associated virus vectors elicit aberrant CD8⁺ T-cell responses in mice. *J Virol.* 81:11840-9.
- LIN, S.W., S.E. HENSLEY, N. TATSIS, M.O. LASARO, and H.C. ERTL. 2007b. Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8⁺ T cells in mice. *J Clin Invest.* 117:3958-70.
- LINDEN, R.M., P. WARD, C. GIRAUD, E. WINOCOUR, and K.I. BERNS. 1996. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11288-94.
- LIU, D.W., Y.P. TSAO, J.T. KUNG, Y.A. DING, H.K. SYTWU, X. XIAO, and S.L. CHEN. 2000. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol.* 74:2888-94.
- LIU, Y., M. CHIRIVA-INTERNATI, C. YOU, R. LUO, H. YOU, C.K. PRASAD, F. GRIZZI, E. COBOS, V.S. KLIMBERG, H. KAY, J.L. MEHTA, and P.L. HERMONAT. 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.
- LIU, Y.L., F. MINGOZZI, S.M. RODRIGUEZ-COLON, S. JOSEPH, E. DOBRZYNSKI, T. SUZUKI, K.A. HIGH, and R.W. HERZOG. 2004. Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector. *Hum Gene Ther.* 15:783-92.
- LJUNG, R.C. 1998. Can haemophilic arthropathy be prevented? *Br J Haematol.* 101:215-9.
- LOCHRIE, M.A., G.P. TATSUNO, B. CHRISTIE, J.W. MCDONNELL, S. ZHOU, R. SUROSKY, G.F. PIERCE, and P. COLOSI. 2006. Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization. *J Virol.* 80:821-34.
- LOFQVIST, T., I.M. NILSSON, E. BERNTORP, and H. PETTERSSON. 1997. Haemophilia prophylaxis in young patients--a long-term follow-up. *J Intern Med.* 241:395-400.
- LOGAN, G.J., L. WANG, M. ZHENG, S.C. CUNNINGHAM, R.L. COPPEL, and I.E. ALEXANDER. 2007. AAV vectors encoding malarial antigens stimulate antigen-specific immunity but do not protect from parasite infection. *Vaccine.* 25:1014-22.
- LOILER, S.A., T.J. CONLON, S. SONG, Q. TANG, K.H. WARRINGTON, A. AGARWAL, M. KAPTURCZAK, C. LI, C. RICORDI, M.A. ATKINSON, N. MUZYCZKA, and T.R. FLOTTE. 2003. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* 10:1551-8.
- LOILER, S.A., Q. TANG, T. CLARKE, M.L. CAMPBELL-THOMPSON, V. CHIDO, W. HAUSWIRTH, P. CRUZ, M. PERRET-GENTIL, M.A. ATKINSON, V.K. RAMIYA, and T.R. FLOTTE. 2005. Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. *Mol Ther.* 12:519-27.
- LORAIN, S., D.A. GROSS, A. GOYENVALLE, O. DANOS, J. DAVOUST, and L. GARCIA. 2008. Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol Ther.* 16:541-7.
- LOWENSTEIN, P.R., R.J. MANDEL, W.D. XIONG, K. KROEGER, and M.G. CASTRO. 2007. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene

- therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr Gene Ther.* 7:347-60.
- LU, Y., Y.K. CHOI, M. CAMPBELL-THOMPSON, C. LI, Q. TANG, J.M. CRAWFORD, T.R. FLOTTE, and S. SONG. 2006. Therapeutic level of functional human alpha 1 antitrypsin (hAAT) secreted from murine muscle transduced by adeno-associated virus (rAAV1) vector. *J Gene Med.* 8:730-5.
- MAHESHRI, N., J.T. KOERBER, B.K. KASPAR, and D.V. SCHAFFER. 2006. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol.* 24:198-204.
- MANNING, W.C., X. PALIARD, S. ZHOU, M. PAT BLAND, A.Y. LEE, K. HONG, C.M. WALKER, J.A. ESCOBEDO, and V. DWARKI. 1997. Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol.* 71:7960-2.
- MANNING, W.C., S. ZHOU, M.P. BLAND, J.A. ESCOBEDO, and V. DWARKI. 1998. Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 9:477-85.
- MANNO, C.S., A.J. CHEW, S. HUTCHISON, P.J. LARSON, R.W. HERZOG, V.R. ARRUDA, S.J. TAI, M.V. RAGNI, A. THOMPSON, M. OZELO, L.B. COUTO, D.G. LEONARD, F.A. JOHNSON, A. MCCLELLAND, C. SCALLAN, E. SKARSGARD, A.W. FLAKE, M.A. KAY, K.A. HIGH, and B. GLADER. 2003. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood.* 101:2963-72.
- MANNO, C.S., G.F. PIERCE, V.R. ARRUDA, B. GLADER, M. RAGNI, J.J. RASKO, M.C. OZELO, K. HOOTS, P. BLATT, B. KONKLE, M. DAKE, R. KAYE, M. RAZAVI, A. ZAJKO, J. ZEHNDER, P.K. RUSTAGI, H. NAKAI, A. CHEW, D. LEONARD, J.F. WRIGHT, R.R. LESSARD, J.M. SOMMER, M. TIGGES, D. SABATINO, A. LUK, H. JIANG, F. MINGOZZI, L. COUTO, H.C. ERTL, K.A. HIGH, and M.A. KAY. 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 12:342-7.
- MANSFIELD, S.G., H. CHAO, and C.E. WALSH. 2004. RNA repair using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Trends Mol Med.* 10:263-8.
- MANSFIELD, S.G., R.H. CLARK, M. PUTTARAJU, J. KOLE, J.A. COHN, L.G. MITCHELL, and M.A. GARCIA-BLANCO. 2003. 5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Rna.* 9:1290-7.
- MARODON, G., S. FISSON, B. LEVACHER, M. FABRE, B.L. SALOMON, and D. KLATZMANN. 2006. Induction of antigen-specific tolerance by intrathymic injection of lentiviral vectors. *Blood.* 108:2972-8.
- MAS, A., J. MONTANE, X.M. ANGUELA, S. MUNOZ, A.M. DOUAR, E. RIU, P. OTAEGUI, and F. BOSCH. 2006. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes.* 55:1546-53.
- MASTAKOV, M.Y., K. BAER, C.W. SYMES, C.B. LEICHTLEIN, R.M. KOTIN, and M.J. DURING. 2002. Immunological aspects of recombinant adeno-associated virus delivery to the mammalian brain. *J Virol.* 76:8446-54.
- MCADAM, A.J., A.N. SCHWEITZER, and A.H. SHARPE. 1998. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev.* 165:231-47.
- MCCARTY, D.M. 2008. Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol Ther.*
- MCCARTY, D.M., H. FU, P.E. MONAHAN, C.E. TOULSON, P. NAIK, and 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 Ther.* 10:2112-8.
- MCCARTY, D.M., P.E. MONAHAN, and R.J. SAMULSKI. 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8:1248-54.
- MEYLAN, E., and J. TSCHOPP. 2006. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell.* 22:561-9.
- MEYLAN, E., J. TSCHOPP, and M. KARIN. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 442:39-44.
- MIAO, C.H. 2007. Recent advances in immune modulation. *Curr Gene Ther.* 7:391-402.
- MIAO, C.H., H. NAKAI, A.R. THOMPSON, T.A. STORM, W. CHIU, R.O. SNYDER, and M.A. KAY. 2000. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol.* 74:3793-803.
- MIAO, C.H., R.O. SNYDER, D.B. SCHOWALTER, G.A. PATIJN, B. DONAHUE, B. WINTHER, and M.A. KAY. 1998. The kinetics of rAAV integration in the liver. *Nat Genet.* 19:13-5.
- MIAO, C.H., P. YE, A.R. THOMPSON, D.J. RAWLINGS, and H.D. OCHS. 2006. Immunomodulation of transgene responses following naked DNA transfer of human factor VIII into hemophilia A mice. *Blood.* 108:19-27.
- MILLER, A.D. 1998. Cationic liposome systems in gene therapy. *IDrugs.* 1:574-83.
- MILLS, J.L., and J.M. PORTER. 1991. Basic data related to clinical decision-making in acute limb ischemia. *Ann Vasc Surg.* 5:96-8.
- MINGOZZI, F., N.C. HASBROUCK, E. BASNER-TSCHAKARJAN, S.A. EDMONSON, D.J. HUI, D.E. SABATINO, S. ZHOU, J.F. WRIGHT, H. JIANG, G.F. PIERCE, V.R. ARRUDA, and K.A. HIGH. 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., and K.A. HIGH. 2007. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther.* 7:316-24.
- MINGOZZI, F., Y.L. LIU, E. DOBRZYNSKI, A. KAUFHOLD, J.H. LIU, Y. WANG, V.R. ARRUDA, K.A. HIGH, and R.W. HERZOG. 2003. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest.* 111:1347-56.
- MINGOZZI, F., M.V. MAUS, D.J. HUI, D.E. SABATINO, S.L. MURPHY, J.E. RASKO, M.V. RAGNI, C.S. MANNO, J. SOMMER, H. JIANG, G.F. PIERCE, H.C. ERTL, and K.A. HIGH. 2007b. CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med.* 13:419-22.
- MINGOZZI, F., J. MEULENBERG, D. HUI, E. BASNER-TSCHKARAJAN, A. DE JONG, P. POS, and K. HIGH. 2007c. Capsid-specific T cell responses in humans upon intramuscular administration of an AAV-1 vector expressing LPL^{S447X} transgene. *Hum Gene Ther.* 18:991-992.
- MINGOZZI, F., J. MEULENBERG, D. HUI, E. BASNER-TSCHKARAJAN, A. DE JONG, P. POS, and K. HIGH. 2007d. Intramuscular administration of an AAV-1 vector in humans results in capsid-specific T cell responses. *Mol Ther.* 15:S403.
- MINGOZZI, F., J. MEULENBERG, D. HUI, E. BASNER-TSCHKARAJAN, N. HASBROUCK, A. DE JONG, P. POS, N. HUTNICK, M. BETTS, and K. HIGH. 2008. T Cell Responses to Capsid in AAV-1-Mediated Gene Transfer to Skeletal Muscle. *Mol Ther.* 16:S162.

- MIZUGUCHI, H., and T. HAYAKAWA. 2002. The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector. *J Gene Med.* 4:240-7.
- MIZUKAMI, H., J. MIMURO, T. OGURA, T. OKADA, M. URABE, A. KUME, Y. SAKATA, and K. OZAWA. 2006. Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 17:921-8.
- MONAHAN, P.E., and R.J. SAMULSKI. 2000. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther.* 7:24-30.
- MONAHAN, P.E., R.J. SAMULSKI, J. TAZELAAR, X. XIAO, T.C. NICHOLS, D.A. BELLINGER, M.S. READ, and C.E. WALSH. 1998. Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther.* 5:40-9.
- MONTIER, T., P. DELEPINE, C. PICHON, C. FEREC, D.J. PORTEOUS, and P. MIDOUX. 2004. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 22:586-92.
- MOOSMANN, P., O. GEORGIEV, H.J. THIESEN, M. HAGMANN, and W. SCHAFFNER. 1997. Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol Chem.* 378:669-77.
- MORELAND, L.W., R. ALTEN, F. VAN DEN BOSCH, T. APPELBOOM, M. LEON, P. EMERY, S. COHEN, M. LUGGEN, W. SHERGY, I. NUAMAH, and J.C. BECKER. 2002. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum.* 46:1470-9.
- MOSCIANI, D., H. MORIZONO, R.J. MCCARTER, A. STERN, J. CABRERA-LUQUE, A. HOANG, J. SANMIGUEL, D. WU, P. BELL, G.P. GAO, S.E. RAPER, J.M. WILSON, and M.L. BATSHAW. 2006. Long-term correction of ammonia metabolism and prolonged survival in ornithine transcarbamylase-deficient mice following liver-directed treatment with adeno-associated viral vectors. *Mol Ther.* 14:25-33.
- MOSKALENKO, M., L. CHEN, M. VAN ROEY, B.A. DONAHUE, R.O. SNYDER, J.G. MCARTHUR, and S.D. PATEL. 2000. Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol.* 74:1761-6.
- MOSS, R.B., D. RODMAN, L.T. SPENCER, M.L. AITKEN, P.L. ZEITLIN, D. WALTZ, C. MILLA, A.S. BRODY, J.P. CLANCY, B. RAMSEY, N. HAMBLETT, and A.E. HEALD. 2004. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest.* 125:509-21.
- MOUNT, J.D., R.W. HERZOG, D.M. TILLSON, S.A. GOODMAN, N. ROBINSON, M.L. MCCLELAND, D. BELLINGER, T.C. NICHOLS, V.R. ARRUDA, C.D. LOTHROP, JR., and K.A. HIGH. 2002. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood.* 99:2670-6.
- MUELLER, C., and T.R. FLOTTE. 2008. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 15:858-63.
- MULLER, O.J., F. KAUL, M.D. WEITZMAN, R. PASQUALINI, W. ARAP, J.A. KLEINSCHMIDT, and M. TREPEL. 2003. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nat Biotechnol.* 21:1040-6.

- MURPHY, S.L., H. LI, S. ZHOU, A. SCHLACHTERMAN, and K.A. HIGH. 2008. Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adeno-associated vectors targeted to the liver. *Mol Ther.* 16:138-45.
- MUZYCZKA, N. 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 158:97-129.
- NAKAI, H., S. FUESS, T.A. STORM, L.A. MEUSE, and M.A. KAY. 2003a. Free DNA ends are essential for concatemerization of synthetic double-stranded adeno-associated virus vector genomes transfected into mouse hepatocytes in vivo. *Mol Ther.* 7:112-21.
- NAKAI, H., S. FUESS, T.A. STORM, S. MURAMATSU, Y. NARA, and M.A. KAY. 2005a. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. *J Virol.* 79:214-24.
- NAKAI, H., Y. IWAKI, M.A. KAY, and L.B. COUTO. 1999. Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J Virol.* 73:5438-47.
- NAKAI, H., E. MONTINI, S. FUESS, T.A. STORM, M. GROMPE, and M.A. KAY. 2003b. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet.* 34:297-302.
- NAKAI, H., T.A. STORM, and M.A. KAY. 2000. Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. *Nat Biotechnol.* 18:527-32.
- NAKAI, H., X. WU, S. FUESS, T.A. STORM, D. MUNROE, E. MONTINI, S.M. BURGESS, M. GROMPE, and M.A. KAY. 2005b. Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. *J Virol.* 79:3606-14.
- NAKAI, H., S.R. YANT, T.A. STORM, S. FUESS, L. MEUSE, and M.A. KAY. 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol.* 75:6969-76.
- NATHWANI, A.C., A.M. DAVIDOFF, H. HANAWA, Y. HU, F.A. HOFFER, A. NIKANOROV, C. SLAUGHTER, C.Y. NG, J. ZHOU, J.N. LOZIER, T.D. MANDRELL, E.F. VANIN, and A.W. NIENHUIS. 2002. Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood.* 100:1662-9.
- NATHWANI, A.C., J.T. GRAY, J. MCINTOSH, C.Y. NG, J. ZHOU, Y. SPENCE, M. COCHRANE, E. GRAY, E.G. TUDDENHAM, and A.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.* 109:1414-21.
- NATHWANI, A.C., J.T. GRAY, C.Y. NG, J. ZHOU, Y. SPENCE, S.N. WADDINGTON, E.G. TUDDENHAM, G. KEMBALL-COOK, J. MCINTOSH, M. BOON-SPIJKER, K. MERTENS, and A.M. DAVIDOFF. 2006. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood.* 107:2653-61.
- NATKUNARAJAH, M., P. TRITTIBACH, J. MCINTOSH, Y. DURAN, S.E. BARKER, A.J. SMITH, A.C. NATHWANI, and R.R. ALI. 2008. Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther.* 15:463-7.

- NI, S., K. BERNT, A. GAGGAR, Z.Y. LI, H.P. KIEM, and A. LIEBER. 2005. Evaluation of biodistribution and safety of adenovirus vectors containing group B fibers after intravenous injection into baboons. *Hum Gene Ther.* 16:664-77.
- NIERMAN, M., J. TWISK, W. HERMENS, A.C. BAKKER, S. VAN DEVENTER, B. REKKE, J. KASTELEIN, E. ERIK STROES, J.A. KUIVENHOVEN, and J. MEULENBERG. 2007. Safety and efficacy of AMT-010, an adeno-associated virus-based gene therapy vector administered to lipoprotein lipase-deficient subjects. *Hum Gene Ther.* 18:942.
- NISHIYAMA, A., B.N. AMPONG, S. OHSHIMA, J.H. SHIN, H. NAKAI, M. IMAMURA, Y. MIYAGOE-SUZUKI, T. OKADA, and S. TAKEDA. 2008. Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther.* 19:719-30.
- NO, D., T.P. YAO, and R.M. EVANS. 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3346-51.
- NOONE, P.G., K.W. HOHNEKER, Z. ZHOU, L.G. JOHNSON, C. FOY, C. GIPSON, K. JONES, T.L. NOAH, M.W. LEIGH, C. SCHWARTZBACH, J. EFTHIMIOU, R. PEARLMAN, R.C. BOUCHER, and M.R. KNOWLES. 2000. Safety and biological efficacy of a lipid-CFTR complex for gene transfer in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Mol Ther.* 1:105-14.
- PACAK, C.A., C.S. MAH, B.D. THATTALIYATH, T.J. CONLON, M.A. LEWIS, D.E. CLOUTIER, I. ZOLOTUKHIN, A.F. TARANTAL, and B.J. BYRNE. 2006. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res.* 99:e3-9.
- PALOMEQUE, J., E.R. CHEMALY, P. COLOSI, J.A. WELLMAN, S. ZHOU, F. DEL MONTE, and R.J. HAJJAR. 2007. Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther.* 14:989-97.
- PAREKH-OLMEDO, H., L. FERRARA, E. BRACHMAN, and E.B. KMIIEC. 2005. Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair. *Gene Ther.* 12:639-46.
- PEDEN, C.S., C. BURGER, N. MUZYCZKA, and R.J. MANDEL. 2004. Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. *J Virol.* 78:6344-59.
- PELLETIER, R., S.O. CARON, and J. PUYMIRAT. 2006. RNA based gene therapy for dominantly inherited diseases. *Curr Gene Ther.* 6:131-46.
- PENAUD-BUDLOO, M., C. LE GUINER, A. NOWROUZI, A. TOROMANOFF, Y. CHEREL, P. CHENUAUD, M. SCHMIDT, C. VON KALLE, F. ROLLING, P. MOULLIER, and R.O. SNYDER. 2008. Adeno-associated Viral Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J Virol.*
- PERABO, L., H. BUNING, D.M. KOFLER, M.U. RIED, A. GIROD, C.M. WENDTNER, J. ENSSLE, and M. HALLEK. 2003. In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther.* 8:151-7.
- PERRICONE, M.A., J.E. MORRIS, K. PAVELKA, M.S. PLOG, B.P. O'SULLIVAN, P.M. JOSEPH, H. DORKIN, A. LAPEY, R. BALFOUR, D.P. MEEKER, A.E. SMITH, S.C. WADSWORTH, and J.A. ST GEORGE. 2001. Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. Transfection efficiency in airway epithelium. *Hum Gene Ther.* 12:1383-94.
- PHILPOTT, N.J., J. GOMOS, K.I. BERNS, and E. FALCK-PEDERSEN. 2002. A p5 integration efficiency element mediates Rep-dependent integration into AAVS1 at chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12381-5.

- PONDER, K.P., B. WANG, P. WANG, X. MA, R. HERATI, K. CULLEN, P. O'DONNELL, N.M. ELLINWOOD, A. TRAAS, T.M. PRIMEAU, and M.E. HASKINS. 2006. Mucopolysaccharidosis I cats mount a cytotoxic T lymphocyte response after neonatal gene therapy that can be blocked with CTLA4-Ig. *Mol Ther.* 14:5-13.
- PONNAZHAGAN, S., G. MAHENDRA, D.T. CUIEL, and D.R. SHAW. 2001. Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for ex vivo immunotherapy. *J Virol.* 75:9493-501.
- PONNAZHAGAN, S., G. MAHENDRA, S. KUMAR, J.A. THOMPSON, and M. CASTILLAS, JR. 2002. Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J Virol.* 76:12900-7.
- PORTEUS, M.H., and D. CARROLL. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 23:967-73.
- POWELL, J.S., M.V. RAGNI, G.C. WHITE, 2ND, J.M. LUSHER, C. HILLMAN-WISEMAN, T.E. MOON, V. COLE, S. RAMANATHAN-GIRISH, H. ROEHL, N. SAJJADI, D.J. JOLLY, and D. HURST. 2003. Phase 1 trial of FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion. *Blood.* 102:2038-45.
- PROVOST, N., G. LE MEUR, M. WEBER, A. MENDES-MADEIRA, G. PODEVIN, Y. CHEREL, M.A. COLLE, J.Y. DESCHAMPS, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2005. Biodistribution of rAAV vectors following intraocular administration: evidence for the presence and persistence of vector DNA in the optic nerve and in the brain. *Mol Ther.* 11:275-83.
- PUPPI, J., C. GUILLONNEAU, V. PICHARD, M. BELLODI-PRIVATO, M.C. CUTURI, I. ANEGON, and N. FERRY. 2004. Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. *J Hepatol.* 41:222-8.
- PUTTARAJU, M., S.F. JAMISON, S.G. MANSFIELD, M.A. GARCIA-BLANCO, and L.G. MITCHELL. 1999. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol.* 17:246-52.
- QING, K., C. MAH, J. HANSEN, S. ZHOU, V. DWARKI, and A. SRIVASTAVA. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med.* 5:71-7.
- RABINOWITZ, J.E., D.E. BOWLES, S.M. FAUST, J.G. LEDFORD, S.E. CUNNINGHAM, and R.J. SAMULSKI. 2004. Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *J Virol.* 78:4421-32.
- RABINOWITZ, J.E., F. ROLLING, C. LI, H. CONRATH, W. XIAO, X. XIAO, and R.J. SAMULSKI. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol.* 76:791-801.
- RAUTSI, O., S. LEHMUSVAARA, T. SALONEN, K. HAKKINEN, M. SILLANPAA, T. HAKKARAINEN, S. HEIKKINEN, E. VAHAKANGAS, S. YLA-HERTTUALA, A. HINKKANEN, I. JULKUNEN, J. WAHLFORS, and R. PELLINEN. 2007. Type I interferon response against viral and non-viral gene transfer in human tumor and primary cell lines. *J Gene Med.* 9:122-35.
- REIMSNIDER, S., F.P. MANFREDSSON, N. MUZYCZKA, and R.J. MANDEL. 2007. Time course of transgene expression after intrastriatal pseudotyped rAAV2/1, rAAV2/2, rAAV2/5, and rAAV2/8 transduction in the rat. *Mol Ther.* 15:1504-11.
- REN, C., S. KUMAR, D.R. SHAW, and S. PONNAZHAGAN. 2005. Genomic stability of self-complementary adeno-associated virus 2 during early stages of transduction in mouse muscle in vivo. *Hum Gene Ther.* 16:1047-57.

- RENDAHL, K.G., S.E. LEFF, G.R. OTTEN, S.K. SPRATT, D. BOHL, M. VAN ROEY, B.A. DONAHUE, L.K. COHEN, R.J. MANDEL, O. DANOS, and R.O. SNYDER. 1998. Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol.* 16:757-61.
- RIED, M.U., A. GIROD, K. LEIKE, H. BUNING, and M. HALLEK. 2002. Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol.* 76:4559-66.
- RITTNER, K., H. SCHULTZ, A. PAVIRANI, and M. MEHTALI. 1997. Conditional repression of the E2 transcription unit in E1-E3-deleted adenovirus vectors is correlated with a strong reduction in viral DNA replication and late gene expression in vitro. *J Virol.* 71:3307-11.
- RIVERA, V.M., T. CLACKSON, S. NATESAN, R. POLLOCK, J.F. AMARA, T. KEENAN, S.R. MAGARI, T. PHILLIPS, N.L. COURAGE, F. CERASOLI, JR., D.A. HOLT, and M. GILMAN. 1996. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med.* 2:1028-32.
- RIVERA, V.M., G.P. GAO, R.L. GRANT, M.A. SCHNELL, P.W. ZOLTICK, L.W. ROZAMUS, T. CLACKSON, and J.M. WILSON. 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood.* 105:1424-30.
- RIVIERE, C., O. DANOS, and A.M. DOUAR. 2006. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.* 13:1300-8.
- ROMERO, N.B., S. BRAUN, O. BENVENISTE, F. LETURCQ, J.Y. HOGREL, G.E. MORRIS, A. BAROIS, B. EYMARD, C. PAYAN, V. ORTEGA, A.L. BOCH, L. LEJEAN, C. THIOUDELLET, B. MOUROT, C. ESCOT, A. CHOQUEL, D. RECAN, J.C. KAPLAN, G. DICKSON, D. KLATZMANN, V. MOLINIER-FRENCKEL, J.G. GUILLET, P. SQUIBAN, S. HERSON, and M. FARDEAU. 2004. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther.* 15:1065-76.
- ROSEN, H.R. 2008. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology.* 134:1789-801.
- ROSS, C.J., J. TWISK, A.C. BAKKER, F. MIAO, D. VERBART, J. RIP, T. GODBEY, P. DIJKHUIZEN, W.T. HERMENS, J.J. KASTELEIN, J.A. KUIVENHOVEN, J.M. MEULENBERG, and M.R. HAYDEN. 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.
- ROSS, C.J., J. TWISK, J.M. MEULENBERG, G. LIU, K. VAN DEN OEVER, E. MORAAL, W.T. HERMENS, J. RIP, J.J. KASTELEIN, J.A. KUIVENHOVEN, and M.R. HAYDEN. 2004. Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation. *Hum Gene Ther.* 15:906-19.
- ROTH, D.A., N.E. TAWA, JR., J.M. O'BRIEN, D.A. TRECO, and R.F. SELDEN. 2001. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 344:1735-42.
- RUPERTO, N., D.J. LOVELL, P. QUARTIER, E. PAZ, N. RUBIO-PEREZ, C.A. SILVA, C. ABUD-MENDOZA, R. BURGOS-VARGAS, V. GERLONI, J.A. MELO-GOMES, C. SAAD-MAGALHAES, F. SZTAJNBOK, C. GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, M. SCHEINBERG, I.C. PENADES, M. FISCHBACH, J. OROZCO, P.J. HASHKES, C. HOM, L. JUNG, L. LEPORE, S. OLIVEIRA, C.A. WALLACE, L.H. SIGAL, A.J. BLOCK, A. COVUCCI, A. MARTINI, and E.H. GIANNINI. 2008. Abatacept in

- children with juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled withdrawal trial. *Lancet*. 372:383-91.
- RUSSELL, D.W. 2007. AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer. *Mol Ther*. 15:1740-3.
- RUSSELL, D.W., and M.A. KAY. 1999. Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood*. 94:864-74.
- SABATINO, D.E., F. MINGOZZI, D.J. HUI, H. CHEN, P. COLOSI, H.C. ERTL, and K.A. HIGH. 2005. Identification of mouse AAV capsid-specific CD8⁺ T cell epitopes. *Mol Ther*. 12:1023-33.
- SALVETTI, A., S. OREVE, G. CHADEUF, D. FAVRE, Y. CHEREL, P. CHAMPION-ARNAUD, J. DAVID-AMELINE, and P. MOULLIER. 1998. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther*. 9:695-706.
- SANLIOGLU, S., P.K. BENSON, J. YANG, E.M. ATKINSON, T. REYNOLDS, and J.F. ENGELHARDT. 2000. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*. 74:9184-96.
- SARUKHAN, A., S. CAMUGLI, B. GJATA, H. VON BOEHMER, O. DANOS, and K. JOOSS. 2001. Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol*. 75:269-77.
- SCALLAN, C.D., H. JIANG, T. LIU, S. PATARROYO-WHITE, J.M. SOMMER, S. ZHOU, L.B. COUTO, and G.F. PIERCE. 2006. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood*. 107:1810-7.
- SCHEIPERS, P., and H. REISER. 1998. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:10083-8.
- SCHIFF, M., M. KEISERMAN, C. CODDING, S. SONGCHAROEN, A. BERMAN, S. NAYIAGER, C. SALDATE, T. LI, R. ARANDA, J.C. BECKER, C. LIN, P.L. CORNET, and M. DOUGADOS. 2008. Efficacy and safety of abatacept or infliximab vs placebo in ATTEST: a phase III, multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 67:1096-103.
- SCHLICHTENBREDE, F.C., A. MACNEIL, J.W. BAINBRIDGE, M. TSCHERNUTTER, A.J. THRASHER, A.J. SMITH, and R.R. ALI. 2003. Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene Ther*. 10:523-7.
- SCHMIDT, M., K. SCHWARZWAELDER, C. BARTHOLOMAE, K. ZAOU, C. BALL, I. PILZ, S. BRAUN, H. GLIMM, and C. VON KALLE. 2007. High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat Methods*. 4:1051-7.
- SCHMIDT, M., A. VOUTETAKIS, S. AFIONE, C. ZHENG, D. MANDIKIAN, and J.A. CHIORINI. 2008. Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol*. 82:1399-406.
- SCHNEPP, B.C., K.R. CLARK, D.L. KLEMANSKI, C.A. PACAK, and P.R. JOHNSON. 2003. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol*. 77:3495-504.
- SCHNEPP, B.C., R.L. JENSEN, C.L. CHEN, P.R. JOHNSON, and K.R. CLARK. 2005. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol*. 79:14793-803.

- SCHUETTRUMPF, J., J.H. LIU, L.B. COUTO, K. ADDYA, D.G. LEONARD, Z. ZHEN, J. SOMMER, and V.R. ARRUDA. 2006. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther.* 13:1064-73.
- SCHULTZ, B.R., and J.S. CHAMBERLAIN. 2008. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther.* 16:1189-99.
- SCHUURMAN, H.J., and H.T. SMITH. 2005. Reference values for clinical chemistry and clinical hematology parameters in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation.* 12:72-5.
- SEILER, M.P., A.D. MILLER, J. ZABNER, and C.L. HALBERT. 2006. Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Hum Gene Ther.* 17:10-9.
- SEISENBERGER, G., M.U. RIED, T. ENDRESS, H. BUNING, M. HALLEK, and C. BRAUCHLE. 2001. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science.* 294:1929-32.
- SENATORE, B., A. CAFIERI, I. DI MARINO, M. ROSATI, P.P. DI NOCERA, and G. GRIMALDI. 1999. A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the Kruppel-associated/finger preceding box of zinc finger proteins. *Gene.* 234:381-94.
- SERGUERA, C., D. BOHL, E. ROLLAND, P. PREVOST, and J.M. HEARD. 1999. Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum Gene Ther.* 10:375-83.
- SIPO, I., H. FECHNER, S. PINKERT, L. SUCKAU, X. WANG, S. WEGER, and W. POLLER. 2007. Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction. *Gene Ther.* 14:1319-29.
- SMITH, R.H. 2008. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15:817-22.
- SNANOUDJ, R., H. DE PRENEUF, C. CREPUT, N. ARZOUK, B. DEROURE, S. BEAUDREUIL, A. DURRBACH, and B. CHARPENTIER. 2006. Costimulation blockade and its possible future use in clinical transplantation. *Transpl Int.* 19:693-704.
- SNYDER, R.O. 1999. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med.* 1:166-75.
- SNYDER, R.O., S.K. SPRATT, C. LAGARDE, D. BOHL, B. KASPAR, B. SLOAN, L.K. COHEN, and O. DANOS. 1997. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther.* 8:1891-900.
- SONG, S., P.J. LAIPIS, K.I. BERNS, and T.R. FLOTTE. 2001. Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4084-8.
- SONG, S., M. MORGAN, T. ELLIS, A. POIRIER, K. CHESNUT, J. WANG, M. BRANTLY, N. MUZYCZKA, B.J. BYRNE, M. ATKINSON, and T.R. FLOTTE. 1998. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14384-8.
- SONG, S., M. SCOTT-JORGENSEN, J. WANG, A. POIRIER, J. CRAWFORD, M. CAMPBELL-THOMPSON, and T.R. FLOTTE. 2002. Intramuscular administration of recombinant adeno-associated virus 2 alpha-1 antitrypsin (rAAV-SERPINA1) vectors in a nonhuman primate model: safety and immunologic aspects. *Mol Ther.* 6:329-35.

- STACHLER, M.D., and J.S. BARTLETT. 2006. Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells. *Gene Ther.* 13:926-31.
- STACHLER, M.D., I. CHEN, A.Y. TING, and J.S. BARTLETT. 2008. Site-specific Modification of AAV Vector Particles With Biophysical Probes and Targeting Ligands Using Biotin Ligase. *Mol Ther.*
- STIEGER, K., M.A. COLLE, L. DUBREIL, A. MENDES-MADEIRA, M. WEBER, G. LE MEUR, J.Y. DESCHAMPS, N. PROVOST, D. NIVARD, Y. CHEREL, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2008. Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther.* 16:916-23.
- STIEGER, K., G. LE MEUR, F. LASNE, M. WEBER, J.Y. DESCHAMPS, D. NIVARD, A. MENDES-MADEIRA, N. PROVOST, L. MARTIN, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2006. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther.* 13:967-75.
- STIEGER, K., A. MENDES-MADEIRA, G.L. MEUR, M. WEBER, J.Y. DESCHAMPS, D. NIVARD, N. PROVOST, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2007. Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther.* 14:1668-73.
- SU, L.T., K. GOPAL, Z. WANG, X. YIN, A. NELSON, B.W. KOZYAK, J.M. BURKMAN, M.A. MITCHELL, D.W. LOW, C.R. BRIDGES, and H.H. STEDMAN. 2005. Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation.* 112:1780-8.
- SUMMERFORD, C., J.S. BARTLETT, and R.J. SAMULSKI. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med.* 5:78-82.
- SUMMERFORD, C., and R.J. SAMULSKI. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72:1438-45.
- SUN, B., A. BIRD, S.P. YOUNG, P.S. KISHNANI, Y.T. CHEN, and D.D. KOEBERL. 2007. Enhanced response to enzyme replacement therapy in Pompe disease after the induction of immune tolerance. *Am J Hum Genet.* 81:1042-9.
- SUN, L., J. LI, and X. XIAO. 2000. Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization. *Nat Med.* 6:599-602.
- SZULC, J., M. WIZNEROWICZ, M.O. SAUVAIN, D. TRONO, and P. AEBISCHER. 2006. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods.* 3:109-16.
- TAKEDA, S., M. TAKAHASHI, H. MIZUKAMI, E. KOBAYASHI, K. TAKEUCHI, Y. HAKAMATA, T. KANEKO, H. YAMAMOTO, C. ITO, K. OZAWA, K. ISHIBASHI, T. MATSUZAKI, K. TAKATA, Y. ASANO, and E. KUSANO. 2004. Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo. *Nephron Exp Nephrol.* 96:e119-26.
- TAKESHITA, F., K. TAKASE, M. TOZUKA, S. SAHA, K. OKUDA, N. ISHII, and S. SASAKI. 2007. Muscle creatine kinase/SV40 hybrid promoter for muscle-targeted long-term transgene expression. *Int J Mol Med.* 19:309-15.
- TAYMANS, J.M., L.H. VANDENBERGHE, C.V. HAUTE, I. THIRY, C.M. DEROOSE, L. MORTELMANS, J.M. WILSON, Z. DEBYSER, and V. BAEKELANDT. 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum Gene Ther.* 18:195-206.

- THOMAS, C.E., A. EHRHARDT, and M.A. KAY. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 4:346-58.
- THOMAS, C.E., T.A. STORM, Z. HUANG, and M.A. KAY. 2004. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 78:3110-22.
- THOMAS, G.O., R.P. DUTTON, B. HEMLOCK, D.M. STEIN, M. HYDER, R. SHEREWOLFE, J.R. HESS, and T.M. SCALEA. 2007. Thromboembolic complications associated with factor VIIa administration. *J Trauma.* 62:564-9.
- TIMPE, J., J. BEVINGTON, J. CASPER, J.D. DIGNAM, and J.P. TREMPE. 2005. Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther.* 5:273-84.
- TONIATTI, C., H. BUJARD, R. CORTESE, and G. CILIBERTO. 2004. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther.* 11:649-57.
- TOROMANOFF, A., Y. CHEREL, M. GUILBAUD, M. PENAUD-BUDLOO, R.O. SNYDER, M.E. HASKINS, J.Y. DESCHAMPS, L. GUIGAND, G. PODEVIN, V.R. ARRUDA, K.A. HIGH, H.H. STEDMAN, F. ROLLING, I. ANEGON, P. MOULLIER, and C. LE GUINER. 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.
- TROMBETTA, E.S., and I. MELLMAN. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol.* 23:975-1028.
- URLINGER, S., U. BARON, M. THELLMANN, M.T. HASAN, H. BUJARD, and W. HILLEN. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:7963-8.
- URRUTIA, R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* 4:231.
- VANDENBERGHE, L.H., L. WANG, S. SOMANATHAN, Y. ZHI, J. FIGUEREDO, R. CALCEDO, J. SANMIGUEL, R.A. DESAI, C.S. CHEN, J. JOHNSTON, R.L. GRANT, G. GAO, and J.M. WILSON. 2006. Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat Med.* 12:967-71.
- VANDENBERGHE, L.H., and J.M. WILSON. 2007. AAV as an immunogen. *Curr Gene Ther.* 7:325-33.
- VANDENDRIESSCHE, T., L. THORREZ, A. ACOSTA-SANCHEZ, I. PETRUS, L. WANG, L. MA, D.E.W. L, Y. IWASAKI, V. GILLIJS, J.M. WILSON, D. COLLEN, and M.K. CHUAH. 2007. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost.* 5:16-24.
- VANHOVE, B., and J.P. SOULILLOU. 2005. Technology evaluation: Belatacept, Bristol-Myers Squibb. *Curr Opin Mol Ther.* 7:384-93.
- VAUGHAN, E.E., J.V. DEGIULIO, and D.A. DEAN. 2006. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Curr Gene Ther.* 6:671-81.
- VERON, P., V. ALLO, C. RIVIERE, J. BERNARD, A.M. DOUAR, and C. MASURIER. 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.
- VILABOA, N., and R. VOELLMY. 2006. Regulatable gene expression systems for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 6:421-38.
- VINCENTI, F. 2008. Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* 121:299-306; quiz 307-8.

- VINCENTI, F., C. LARSEN, A. DURRBACH, T. WEKERLE, B. NASHAN, G. BLANCHO, P. LANG, J. GRINYO, P.F. HALLORAN, K. SOLEZ, D. HAGERTY, E. LEVY, W. ZHOU, K. NATARAJAN, and B. CHARPENTIER. 2005. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med.* 353:770-81.
- VINCENT-LACAZE, N., R.O. SNYDER, R. GLUZMAN, D. BOHL, C. LAGARDE, and O. DANOS. 1999. Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol.* 73:1949-55.
- WAGNER, J.A., I.B. NEPOMUCENO, A.H. MESSNER, M.L. MORAN, E.P. BATSON, S. DIMICELI, B.W. BROWN, J.K. DESCH, A.M. NORBASH, C.K. CONRAD, W.B. GUGGINO, T.R. FLOTTE, J.J. WINE, B.J. CARTER, T.C. REYNOLDS, R.B. MOSS, and P. GARDNER. 2002. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Hum Gene Ther.* 13:1349-59.
- WALTERS, R.W., S.M. YI, S. KESHAVJEE, K.E. BROWN, M.J. WELSH, J.A. CHIORINI, and J. ZABNER. 2001. Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem.* 276:20610-6.
- WANG, A.Y., P.D. PENG, A. EHRHARDT, T.A. STORM, and M.A. KAY. 2004. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* 15:405-13.
- WANG, B., J. LI, and X. XIAO. 2000. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13714-9.
- WANG, C., C.M. WANG, K.R. CLARK, and T.J. SFERRA. 2003a. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther.* 10:1528-34.
- WANG, G.M., J.B. MA, Y.Z. JIN, Y.G. FENG, J. HAO, X. GAO, and S.S. XIE. 2006. Long-term survival of cardiac allografts induced by cyclophosphamide combined with CTLA4Ig-gene transfer mediated by adenoviral vector. *Transplant Proc.* 38:3043-5.
- WANG, L., O. CAO, B. SWALM, E. DOBRZYNSKI, F. MINGOZZI, and R.W. HERZOG. 2005a. Major role of local immune responses in antibody formation to factor IX in AAV gene transfer. *Gene Ther.* 12:1453-64.
- WANG, L., E. DOBRZYNSKI, A. SCHLACHTERMAN, O. CAO, and R.W. HERZOG. 2005b. Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response. *Blood.* 105:4226-34.
- WANG, L., J. FIGUEREDO, R. CALCEDO, J. LIN, and J.M. WILSON. 2007a. Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Hum Gene Ther.* 18:185-94.
- WANG, Y., B.W. O'MALLEY, JR., S.Y. TSAI, and B.W. O'MALLEY. 1994. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8180-4.
- WANG, Z., J.M. ALLEN, S.R. RIDDELL, P. GREGOREVIC, R. STORB, S.J. TAPSCOTT, J.S. CHAMBERLAIN, and C.S. KUHR. 2007b. Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther.* 18:18-26.
- WANG, Z., C.S. KUHR, J.M. ALLEN, M. BLANKINSHIP, P. GREGOREVIC, J.S. CHAMBERLAIN, S.J. TAPSCOTT, and R. STORB. 2007c. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther.* 15:1160-6.

- WANG, Z., H.I. MA, J. LI, L. SUN, J. ZHANG, and X. XIAO. 2003b. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10:2105-11.
- WANG, Z., T. ZHU, C. QIAO, L. ZHOU, B. WANG, J. ZHANG, C. CHEN, J. LI, and X. XIAO. 2005c. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol.* 23:321-8.
- WARRINGTON, K.H., JR., O.S. GORBATYUK, J.K. HARRISON, S.R. OPIE, S. ZOLOTUKHIN, and N. MUZYCZKA. 2004. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol.* 78:6595-609.
- WARRINGTON, K.H., JR., and R.W. HERZOG. 2006. Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer. *Hum Genet.* 119:571-603.
- WATCHKO, J., T. O'DAY, B. WANG, L. ZHOU, Y. TANG, J. LI, and X. XIAO. 2002. Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Hum Gene Ther.* 13:1451-60.
- WEBER, M., J. RABINOWITZ, N. PROVOST, H. CONRATH, S. FOLLIOU, D. BRIOT, Y. CHEREL, P. CHENUAUD, J. SAMULSKI, P. MOULLIER, and F. ROLLING. 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. *Mol Ther.* 7:774-81.
- WEBER, W., and M. FUSSENEGGER. 2006. Pharmacologic transgene control systems for gene therapy. *J Gene Med.* 8:535-56.
- WIZNEROWICZ, M., and D. TRONO. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol.* 77:8957-61.
- WOBUS, C.E., B. HUGLE-DORR, A. GIROD, G. PETERSEN, M. HALLEK, and J.A. KLEINSCHMIDT. 2000. Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsid domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *J Virol.* 74:9281-93.
- WU, Z., A. ASOKAN, J.C. GRIEGER, L. GOVINDASAMY, M. AGBANDJE-MCKENNA, and R.J. SAMULSKI. 2006a. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes. *J Virol.* 80:11393-7.
- WU, Z., E. MILLER, M. AGBANDJE-MCKENNA, and R.J. SAMULSKI. 2006b. Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6. *J Virol.* 80:9093-103.
- WUENSCH, S.A., R.H. PIERCE, and I.N. CRISPE. 2006. Local intrahepatic CD8+ T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation. *J Immunol.* 177:1689-97.
- XIAO, W., N. CHIRMULE, S.C. BERTA, B. MCCULLOUGH, G. GAO, and J.M. WILSON. 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol.* 73:3994-4003.
- XIAO, X., J. LI, and R.J. SAMULSKI. 1996. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol.* 70:8098-108.
- XIN, K.Q., H. MIZUKAMI, M. URABE, Y. TODA, K. SHINODA, A. YOSHIDA, K. OOMURA, Y. KOJIMA, M. ICHINO, D. KLINMAN, K. OZAWA, and K. OKUDA. 2006. Induction of robust immune responses against human immunodeficiency virus is supported by the inherent tropism of adeno-associated virus type 5 for dendritic cells. *J Virol.* 80:11899-910.

- XIN, K.Q., T. OOKI, H. MIZUKAMI, K. HAMAJIMA, K. OKUDELA, K. HASHIMOTO, Y. KOJIMA, N. JOUNAI, Y. KUMAMOTO, S. SASAKI, D. KLINMAN, K. OZAWA, and K. OKUDA. 2002. Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum Gene Ther.* 13:1571-81.
- XIN, K.Q., M. URABE, J. YANG, K. NOMIYAMA, H. MIZUKAMI, K. HAMAJIMA, H. NOMIYAMA, T. SAITO, M. IMAI, J. MONAHAN, K. OKUDA, and K. OZAWA. 2001. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther.* 12:1047-61.
- YAN, Z., Y. ZHANG, D. DUAN, and J.F. ENGELHARDT. 2000. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6716-21.
- YANCOPOULOS, G.D., S. DAVIS, N.W. GALE, J.S. RUDGE, S.J. WIEGAND, and J. HOLASH. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407:242-8.
- YE, X., V.M. RIVERA, P. ZOLTICK, F. CERASOLI, JR., M.A. SCHNELL, G. GAO, J.V. HUGHES, M. GILMAN, and J.M. WILSON. 1999. Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science.* 283:88-91.
- YOSHIMURA, M., M. SAKAMOTO, M. IKEMOTO, Y. MOCHIZUKI, K. YUASA, Y. MIYAGOE-SUZUKI, and S. TAKEDA. 2004. AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther.* 10:821-8.
- YUAN, W., and C.R. PARRISH. 2001. Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells. *Virology.* 279:546-57.
- YUASA, K., M. SAKAMOTO, Y. MIYAGOE-SUZUKI, A. TANOUCHI, H. YAMAMOTO, J. LI, J.S. CHAMBERLAIN, X. XIAO, and S. TAKEDA. 2002. Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther.* 9:1576-88.
- YUASA, K., M. YOSHIMURA, N. URASAWA, S. OHSHIMA, J.M. HOWELL, A. NAKAMURA, T. HIJIKATA, Y. MIYAGOE-SUZUKI, and S. TAKEDA. 2007. Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther.* 14:1249-60.
- YUE, Y., and D. DUAN. 2003. Double strand interaction is the predominant pathway for intermolecular recombination of adeno-associated viral genomes. *Virology.* 313:1-7.
- ZAISS, A.K., M.J. COTTER, L.R. WHITE, S.A. CLARK, N.C. WONG, V.M. HOLERS, J.S. BARTLETT, and D.A. MURUVE. 2008. Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 82:2727-40.
- ZAISS, A.K., Q. LIU, G.P. BOWEN, N.C. WONG, J.S. BARTLETT, and D.A. MURUVE. 2002. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 76:4580-90.
- ZAISS, A.K., and D.A. MURUVE. 2005. Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther.* 5:323-31.
- ZAISS, A.K., and D.A. MURUVE. 2008. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther.* 15:808-16.
- ZHANG, T.P., D.Y. JIN, R.M. WARDROP, 3RD, T. GUI, R. MAILE, J.A. FRELINGER, D.W. STAFFORD, and P.E. MONAHAN. 2007. Transgene expression levels and kinetics determine risk of humoral immune response modeled in factor IX knockout and missense mutant mice. *Gene Ther.* 14:429-40.

- ZHANG, Y., N. CHIRMULE, G. GAO, and J. WILSON. 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.
- ZHONG, L., B. LI, C.S. MAH, L. GOVINDASAMY, M. AGBANDJE-MCKENNA, M. COOPER, R.W. HERZOG, I. ZOLOTUKHIN, K.H. WARRINGTON, JR., K.A. WEIGEL-VAN AKEN, J.A. HOBBS, S. ZOLOTUKHIN, N. MUZYCZKA, and A. SRIVASTAVA. 2008. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:7827-32.
- ZHU, T., L. ZHOU, S. MORI, Z. WANG, C.F. MCTIERNAN, C. QIAO, C. CHEN, D.W. WANG, J. LI, and X. XIAO. 2005. Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation.* 112:2650-9.
- ZIEGLER, R.J., S.M. LONNING, D. ARMENTANO, C. LI, D.W. SOUZA, M. CHERRY, C. FORD, C.M. BARBON, R.J. DESNICK, G. GAO, J.M. WILSON, R. PELUSO, S. GODWIN, B.J. CARTER, R.J. GREGORY, S.C. WADSWORTH, and S.H. CHENG. 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. *Mol Ther.* 9:231-40.

ETUDE DES FACTEURS MODULANT LE TRANSFERT DE GENE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE PRIMATE A L'AIDE D'UN AAV RECOMBINANT

L'*Adeno-Associated Virus* recombinant (AAVr) est un outil thérapeutique performant car, lorsque le système immunitaire n'est pas stimulé, le transfert de gène après une seule administration intramusculaire (IM) se traduit par une expression permanente du transgène. Cependant, l'efficacité du transfert de gène dans le muscle de primate peut être inhibée par le développement d'une réponse immunitaire contre le vecteur et/ou le produit du transgène. Les vecteurs AAVr étant de plus en plus utilisés en essais cliniques, chercher les facteurs impliqués dans l'émergence de cette réponse immunitaire est nécessaire. Nous avons donc étudié chez le macaque la relation entre le mode d'administration (IM ou infusion de membre isolé : RI), le sérotype d'AAVr (1 ou 8), la biodistribution du vecteur et le système immunitaire de l'hôte. Nos résultats montrent que la biodistribution du vecteur est semblable après IM et RI, mais que la voie IM, contrairement à la RI, est associée au développement d'évènements immunologiques dirigés contre le produit du transgène et la capsid du vecteur. L'immunosuppresseur LEA29Y seul n'est pas suffisant pour empêcher l'activation d'une telle réponse immune. Ainsi l'injection IM d'un AAVr chez le primate est associée à une réponse immunitaire délétère, quel que soit le sérotype utilisé. Pour les futurs essais cliniques, il nous apparaît donc indispensable d'administrer le vecteur AAVr par une voie moins immunogène. L'injection d'AAVr par RI semble être une voie prometteuse : elle n'est pas associée au développement d'une réponse immune chez le primate et permet l'expression à long terme du transgène, du moins dans le modèle développé dans notre laboratoire

Mots-clés : vecteur AAV, transfert de gène, muscle, réponse immunitaire, intramusculaire, biodistribution, régulation

FACTORS INFLUENCING rAAV-MEDIATED GENE TRANSFER IN NONHUMAN PRIMATE SKELETAL MUSCLE

Recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) are a powerful therapeutic tool, because when the immune system is not stimulated, gene transfer after a single intramuscular (IM) administration results in sustained transgene expression (> 6 years). However, the efficiency of gene transfer in nonhuman primates is inhibited by the development of an immune response against vector capsid and/or transgene product. AAV vectors being increasingly used in gene therapy clinical trials, looking for factors involved in the development of a such immune response is necessary. We therefore studied in cynomolgus macaques the relationship between the mode of delivery (IM or isolated limb infusion: RI), the rAAV serotype (1 or 8), the vector biodistribution and the host immune system. Our results show that the biodistribution of the vector is similar after IM or RI. However, IM delivery, unlike isolated limb infusion, is associated with the development of immunological events directed against the transgene product and the rAAV capsid. The immunosuppressive molecule LEA29Y alone is not sufficient to inhibit this immune response. Our conclusion is that IM injection of rAAV in primate is associated with a deleterious immune response, regardless of the serotype. For further clinical trials, it is therefore essential to administer AAV vectors via a less immunogenic mode of delivery than IM. Isolated limb infusion delivery seems to be a promising route, since it is not associated with the trigger of an immune response in the primate, and allows long-term transgene expression, at least in our model developed in our laboratory

Key words: AAV vector, gene transfer, muscle, immune response, intramuscular, biodistribution, regulation